

**Untersuchung der Funktion und Regulation des
Progesteron – induzierten Blockierfaktor (PIBF)
mittels RNA Interferenz**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich – Schiller – Universität Jena

2010

von

Cornelia Ute Ermisch

geboren am 01.08.1983 in Zwickau

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Udo R. Markert, Universität Jena
2. Prof. Dr. rer. nat. Ulrike Kämmerer, Universität Würzburg
3. PD Dr. med. Petra Klemm, Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04. April 2011

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	1
Zusammenfassung	3
1. Einleitung	
1.1 Dezidualisation und Implantation	5
1.2 Das Immunsystem während der Schwangerschaft	7
Antigen-Erkennung an der feto-maternalen Grenzfläche	8
Die Schwangerschaft – ein Th2-Phänomen	9
1.3 Progesteron – das Schwangerschaftshormon	10
Progesteronrezeptoren in der Schwangerschaft	11
1.4 PIBF – Progesteron-induzierter Blockierfaktor	12
PIBF – ein essentieller Faktor in der Schwangerschaft	12
PIBF hemmt die Aktivität von NK-Zellen und senkt deren Zytotoxizität	12
PIBF beeinflusst die Th1/Th2-Balance	13
PIBF und der Jak/STAT-Signaltransduktionsweg	14
PIBF hat einen anti-abortiven Effekt	16
1.5 Zusammenfassung der Abfolge der immunologischen Erkennung	17
1.6 PIBF – Struktur , Vorkommen und Lokalisation	18
Struktur und Isoformen von PIBF	18
Vorkommen von PIBF in normalem und malignem Gewebe	19
PIBF-Level in Schwangerschaft vs. Tumor	20
Chromosomale und zentrosomale Lokalisation von PIBF	20
1.7 Anmerkung	21
2. Zielstellung	22

3. Methoden

3.1 Zelllinien und Lymphozyten	23
3.2 Methodenübersicht	26
3.3 Zellkultur	27
3.4 RNA Interferenz	27
Annealing der Oligonukleotide	29
Transfektion von Zellen	29
Transfektion mit Oligofectamin	29
Transfektion mit Nanofectin	30
Mikroporation	30
3.5 Protein – Isolation	31
Zelllyse und Bestimmung der Proteinkonzentration	31
3.6 Proteinnachweis	32
Gelelektrophorese und Western Blot	32
3.7 Immunzytochemie	33
3.8 Durchflusszytometrie	34
3.9 Funktionelle Analysemethoden	36
Proliferations-, Migrations- und Invasionsassay	37
Zytotoxizitätstest und Isolierung von Lymphozyten	38
Durchführung des Zytotoxizitätstests	39
3.10 Dokumentation und statistische Auswertung	41

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung der siRNA-Transfektion und „Knockdown“-Nachweis	42
Analyse verschiedener siRNA-Sequenzen für PIBF	42
Transfektion mit Oligofectamin	42
Transfektion mit Nanofectin	44
Transfektion mittels Mikroporation	46
4.2 Nachweis des PIBF-„Knockdowns“ mittels Immunzytochemie	52
Zentrosomale Lokalisation von 90 kDa PIBF	55
4.3 Die Funktion von PIBF	55
Einfluss von PIBF auf die Proliferation von Zellen	55
Einfluss von PIBF auf die Migration von Zellen	57
Einfluss von PIBF auf die Invasion von Zellen	59

Einfluss von PIBF auf Zytotoxizität	60
4.4 Vergleich der PIBF Expression verschiedener Zelllinien	64
5. Diskussion	
5.1 Die Funktion und Regulation von PIBF	65
5.2 Transfektion der Zellen mit siRNA	65
Etablierung der siRNA Transfektion	66
Transfektion mit liposomalen Transfektionsreagenzien	66
Mikroporation	66
Limitierung der RNA Interferenz	67
Alternativen zu siRNAs	67
„Scrambled“-siRNA/nicht-genomische siRNA	68
5.3 „Knockdown“ von PIBF in Zellen	69
Nachweis des „Knockdowns“ mit Immunzytochemie	69
5.4 Funktionelle Analysen von PIBF	70
Einfluss von PIBF auf Proliferation, Migration und Invasion	70
Einfluss von PIBF auf die Zytotoxizität	73
Fehlerbetrachtung	75
5.5 Vergleich der PIBF Expression in verschiedenen Zelllinien	75
Bezug zum Invasionsverhalten der Zellen	76
5.6 Fehlerdiskussion	77
5.7 Schlussfolgerungen und Ausblick	78
Literatur – und Quellenverzeichnis	
Quellenverzeichnis der Abbildungen	81
Literaturverzeichnis	82
Anhang	
Danksagung	I
Ehrenwörtliche Erklärung	II
Verwendete Geräte und Materialien	III
Zusammensetzungen von Puffern, Lösungen und Gelen	VIII

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β-HCG	humanes Choriongonadotropin
BSA	Bovines Serum-Albumin
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA bzw. copy DNA
CFSE	Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorter
FSC	Forward Scatter
FKS	Fetales Kälberserum
γδ -T-Zellen	gamma/delta T-Zellen
GBSS	Gey's Balanced Salt Solution
HGPRT	Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase
HRP	Horse-radish Peroxidase
HLA-G	Human Leukocyte Antigen G
HRP	Horse-radish Peroxidase
IDO	Indoleamine-2,3-dioxygenase
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Jak	Janus Family Tyrosine Kinase
kDa	kilo Dalton
Leu Zip	Leucin Zipper
MHC	Major Histocompatibility Complex

MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonucleid acid
miRNA	microRNA
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NO	Stickstoffmonoxid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Propidiumjodid
PIBF	Progesteron-induzierter Blockierfaktor
PPZ	PIBF-produzierende Zelllinie
PR	Progesteron-Rezeptor
P/S	Penicillin/Streptomycin
R	Rezeptor
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz, RNA interference
rpm	rounds per minute
SCR	„Scrambled“-Kontrolle (=Transfektion mit nicht-genomischer siRNA)
SDS	Sodiumdodecylsulphate
SH2-Domäne	Src Homolgy 2 Domäne
shRNA	short hairpin RNA/ small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
SSC	Sidewards Scatter
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethylenediamin
TCR+	T-Zellrezeptor positiv
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
Th1/Th2	T-Helferzellen Typ1/Typ2
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha

Zusammenfassung

Einleitung

In der Plazenta stehen semi-allogene fetale und maternale Zellen in engem Kontakt zueinander. Das Immunsystem der Mutter hat somit die schwierige Aufgabe, den heranwachsenden Fetus einerseits zu tolerieren, andererseits aber die Mutter vor Pathogenen zu schützen. Hierfür ist eine fein abgestimmte Regulation notwendig. Progesteron spielt als ein wichtiges Schwangerschaftshormon eine bedeutende Rolle. Die immunologischen Effekte von Progesteron werden durch einen Progesteron-induzierten Blockierfaktor (PIBF) vermittelt, der vor allem von Lymphozyten produziert wird. PIBF wirkt anti-abortiv, indem es einen Th2-Zytokinshift bewirkt und die NK-Zell-Aktivität inhibiert. Nicht nur in der Erhaltung der Schwangerschaft, sondern auch in Tumoren scheint PIBF von Bedeutung zu sein. So ist es möglich, dass die Eigenschaften von PIBF, die in der Schwangerschaft eine normale Entwicklung des Fetus ermöglichen, von Tumoren genutzt werden, die selbst fähig sind PIBF zu bilden, um toleriert vom Immunsystem wachsen und metastasieren zu können.

Methoden

Mithilfe der RNA Interferenz sollte die Expression zweier Isoformen von PIBF in einer PIBF-produzierenden Zelllinie ausgeschaltet werden. Hierzu wurden 2 Transfektionsreagenzien und Elektro-Mikroporation getestet sowie 5 verschiedene siRNA Sequenzen für PIBF evaluiert, um einen effizienten „Knockdown“ von PIBF zu erzielen. Die Transfektionsergebnisse wurden durch Western Blot und Immunzytochemie ausgewertet. Im Anschluss an eine Transfektion erfolgten verschiedene funktionelle Tests, um den Einfluss von PIBF auf die Proliferation, Migration und Invasion von Zellen näher zu beleuchten. Weiterhin wurde ein Zytotoxizitätstest mit peripheren Spenderlymphozyten als Effektorzellen etabliert, um die Auswirkung eines PIBF „Knockdowns“ auf die Zytotoxizität von Lymphozyten zu analysieren. Die Zytotoxizität der Lymphozyten wurde nach Inkubation mit den Zielzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Zum Schluss wurde die PIBF Expression in verschiedenen Zelllinien verglichen und ein möglicher Zusammenhang der Expression verschiedener PIBF Isoformen mit dem Invasionsvermögen der Zellen diskutiert.

Ergebnisse

Als optimale Methode für die siRNA-Transfektion stellte sich die Mikroporation heraus. Mit dieser Methode und einer Mischung aus den 5 verschiedenen siRNA Sequenzen konnte ein effizienter und reproduzierbarer „Knockdown“ der beiden PIBF Isoformen, 35 und 90 kDa, erzielt und mittels Western Blot und Immunzytochemie nachgewiesen werden. Weiter konnte die perinukleäre Position der 90 kDa Isoform sowie die zytoplasmatische Position der 35 kDa Isoform in der Immunzytochemie bestätigt werden.

Die funktionellen Tests zeigten eine signifikant niedrigere Proliferation der Zellen nach PIBF „Knockdown“, während die Migration der Zellen keine signifikanten Unterschiede zeigte. Das Invasionsvermögen der Zellen war nach PIBF „Knockdown“ signifikant höher.

Die Zytotoxizität der peripheren Lymphozyten gegenüber den mit PIBF siRNA transfizierten Zellen war signifikant höher.

Der Vergleich der Expression der beiden PIBF Isoformen 35 und 90 kDa in verschiedenen Zelllinien zeigte unterschiedliche Expressionsmuster. Die stärkste Expression beider Isoformen zeigte sich wiederholt bei AC-1M59 Zellen (Hybrid aus Chorionkarzinom- und Trophoblastzellen des 3. Trimenons). Die nicht-kanzerogene Zelllinie HTR8/SVneo zeigte die geringste Expression der 35 kDa Isoform.

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass PIBF nicht nur zur Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen dient, sondern auch in den Zellen, die es produzieren, eine regulatorische Funktion ausübt, indem es die Proliferation fördert und die Invasivität inhibiert. Weiter ist es in der Lage, die Zytotoxizität peripherer Spenderlymphozyten zu senken. Der Vergleich der Expression der beiden PIBF-Isoformen in verschiedenen malignen als auch nicht malignen Zellen erbrachte die Vermutung, dass es einen Zusammenhang zwischen der Expression der Splice-Variante 35 kDa und einer möglichen Dysregulation im Splicing-Mechanismus in Tumorzellen gibt, da diese eine höhere Expression dieser Isoform zeigten.

In unseren Versuchen korreliert das Expressionsmuster verschiedener PIBF-Isoformen mit dem Invasionspotenzial: Zellen, die ein höheres Invasionsvermögen besitzen (z.B. ACH-3P und HTR8/SVneo), zeigten eine niedrigere PIBF-Expression, vor allem der 35 kDa Isoform. Mit dieser Arbeit konnten wir die vielfältigen Funktionen, sowohl von sezerniertem PIBF auf die Umgebung der produzierenden Zellen unterstreichen, als auch regulatorische Funktionen in den produzierenden Zellen selbst demonstrieren.

1. Einleitung

Die Schwangerschaft ist auf der einen Seite ein natürliches und selbstverständliches Geschehen und stellt doch eine der größten Herausforderungen für den Organismus und das Immunsystem der Mutter dar. Der mütterliche Organismus muss die allogenen Spermien und semi-allophen fetalen Zellen tolerieren und das Wachstum und die Entwicklung des semi-allophen Fetus unterstützen. Gleichzeitig muss der mütterliche Organismus auch vor Pathogenen geschützt werden. Um diese Herausforderung an das Immunsystem zu meistern, ist eine präzise immunologische Regulation von enormer Bedeutung.

1.1 Dezidualisation und Implantation

Die Implantation wird etwa sechs bis sieben Tage nach der Konzeption durch das Verkleben der Blastozyste mit ihrem embryonalen Pol an das Endometrium eingeleitet. Für eine erfolgreiche Implantation muss das Endometrium in die Dezidua umgewandelt werden. Hierzu gehört die Modifizierung endometrialer Stromazellen, uteriner Drüsen und Gefäße sowie eine verstärkte Einwanderung von Immunzellen (Lunghi et al. 2007). Ca. 70 % der immunkompetenten Zellen der Dezidua sind CD45+ Leukozyten, darunter hauptsächlich Natürliche Killer (NK) -Zellen und antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen und dendritische Zellen) (Poehlmann et al. 2006). T- und B-Zellen sowie neutrophile Granulozyten und Mastzellen sind nur in geringer Zahl vorhanden. Die Dezidua ist der Teil der Plazenta, wo ein direkter Kontakt zwischen mütterlichen und fetalen Zellen stattfindet. Folglich spielt sie eine wichtige Rolle bei der Akzeptanz des Fetus und der Kontrolle der Trophoblastinvasion (Nieuwenhoven et al. 2003). Die Abbildung 1.1 zeigt die fetomaternalen Grenzflächen innerhalb der Plazenta.

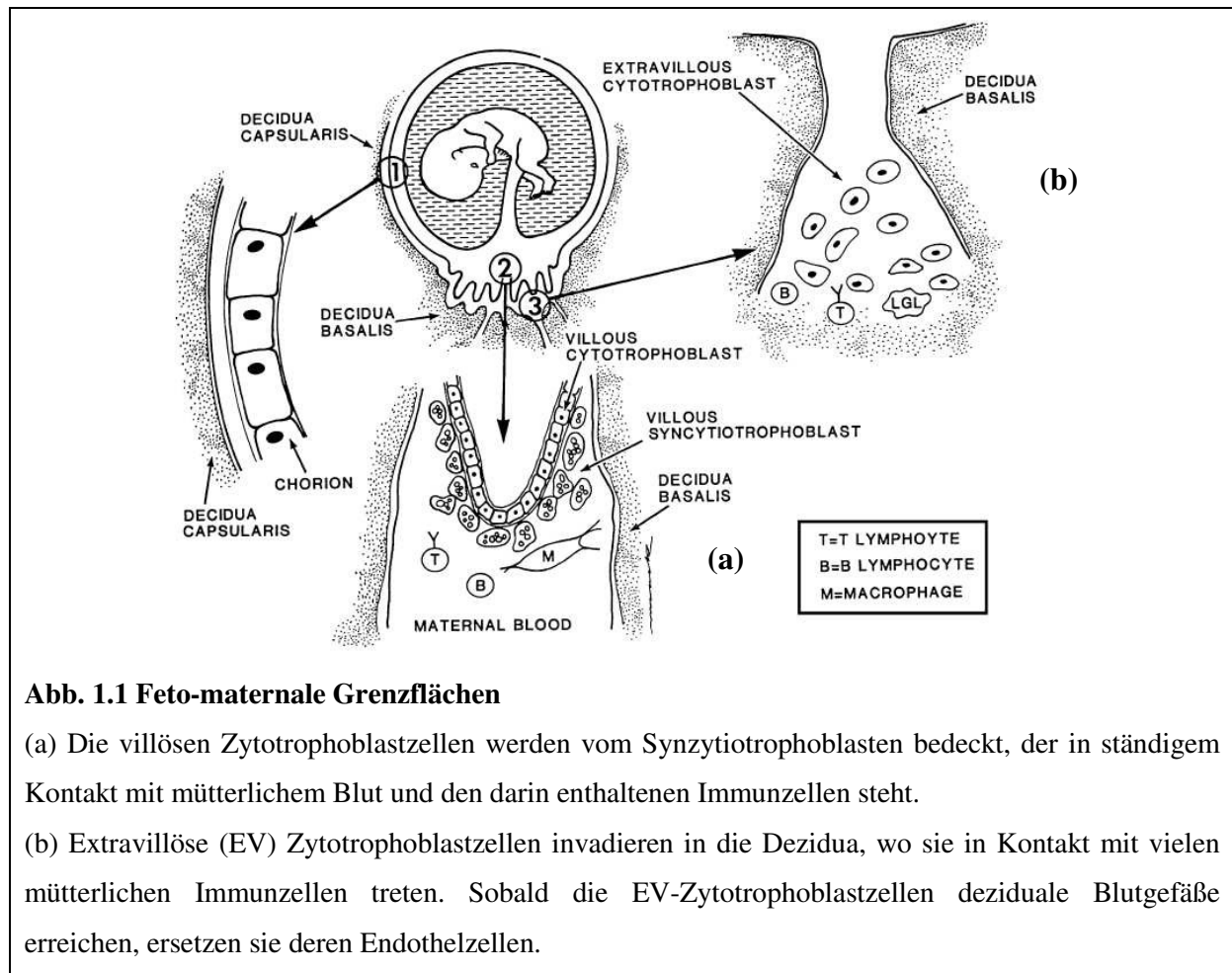


Abb. 1.1 Feto-maternale Grenzflächen

(a) Die villösen Zytotrophoblastzellen werden vom Synzytiotrophoblasten bedeckt, der in ständigem Kontakt mit mütterlichem Blut und den darin enthaltenen Immunzellen steht.

(b) Extravillöse (EV) Zytotrophoblastzellen invadieren in die Dezidua, wo sie in Kontakt mit vielen mütterlichen Immunzellen treten. Sobald die EV-Zytotrophoblastzellen deziduale Blutgefäße erreichen, ersetzen sie deren Endothelzellen.

Störungen der Dezidualisation führen zur Menstruation und zum Verlust der Blastozyste. Die Trophoblastzellen entwickeln sich in Synzytiotrophoblasten und in Zytotrophoblasten. Das Ziel der sich entwickelnden Plazenta ist, eine kontinuierliche Ernährung des Fetus zu gewährleisten. Dies erfordert den Kontakt mütterlichen Blutes mit einer großen Kontaktfläche, dem Synzytiotrophoblasten. Es folgt die Proliferation und Invasion des extravillösen Trophoblasten in das enzymatisch aufgelöste Endometrium, wodurch eine Grube entsteht, in die die Blastozyste hineinsinkt. Eine endovaskuläre Invasion von extravillösen Trophoblastzellen führt zu einer Remodelierung der Spiralarterien, wobei die Trophoblastzellen die Endothelzellen ersetzen, und somit der utero-plazentare Kreislauf gebildet wird (Soundararajan und Rao 2004). Der entstehende erweiterte Gefäßdurchmesser sowie der verstärkte Blutstrom sind für die Versorgung des Fetus mit Nährstoffen und Sauerstoff essentiell. Eine unkontrollierte Invasion oder fehlerhafte Gefäßumstrukturierung kann zu schwerwiegenden Komplikationen während der Schwangerschaft (wie z.B. Präeklampsie) führen.

Das rapide Proliferationsvermögen sowie die Invasivität des Trophoblasten während der Implantationsphase lassen viele Ähnlichkeiten mit dem Verhalten von Tumorzellen erkennen (Soundararajan und Rao 2004). Doch wird die Invasion der Trophoblasten streng reguliert und ist räumlich und zeitlich begrenzt, während maligne Zellen unkontrolliert invadieren und das umgebende Gewebe zerstören.

Ein genaueres Verständnis dieser wichtigen ersten Schritte am Beginn einer Schwangerschaft könnte dazu beitragen, die Pathogenese von rezidivierenden Aborten oder die Entstehung der Präeklampsie, die mit einer inadäquaten Trophoblastinvasion assoziiert ist, besser zu verstehen und möglicherweise zu therapieren. Für die Krebsforschung besteht die Möglichkeit genaue Erkenntnisse für die Entwicklung neuer Krebstherapien zu nutzen, da Krebszellen womöglich genau die Mechanismen ausnutzen, die in der Schwangerschaft kontrolliert und begrenzt geschehen, um ungestört vom Immunsystem proliferieren und metastasieren zu können.

1.2 Das Immunsystem während der Schwangerschaft

Das Immunsystem hat während der Schwangerschaft die schwierige Aufgabe, zum einen die spezifische adaptive Immunantwort herunter zu regulieren und zum anderen darf die Fähigkeit zum Kampf gegen Infektionen und Tumorentstehung nicht verloren gehen (Mincheva-Nilsson 2003). 1953 beschrieb Sir Peter Medawar als erster den Embryo als ein „Semi-Allograft“, das überlebt, weil die immunologische Interaktion zwischen ihm und der Mutter supprimiert wird (Medawar 1953). Die Expression von mütterlichen und väterlichen MHC-Antigenen macht den Embryo zu einem „Semi-Allograft“. Deshalb ist er ein potenzielles Ziel für das mütterliche Immunsystem und gefährdet im Sinne einer Abstoßungsreaktion. Einige Faktoren, die für das Überleben des Embryo als „Semi-Allograft“ von großer Bedeutung sind:

1. Fehlen von MHC auf Trophoblasten
2. eine sensible Th1/Th2-Regulation
3. Ausschüttung von Zytokinen

Durch diese verschiedenen Mechanismen, die dem Fetus ein normales Wachstum und eine normale Entwicklung ermöglichen und ihn vor einer Abstoßung durch das mütterliche Immunsystem schützen, könnte man ihn auch als ein erfolgreiches Allograft, Tumor oder auch als Parasit bezeichnen (Geis und Dietl 2001). Zwischen diesen verschiedenen Faktoren ist ein sensibles Gleichgewicht für den Erhalt der Schwangerschaft essentiell.

Antigen-Erkennung an der feto-maternalen Grenzfläche löst eine Immunreaktion aus

50% der fetalen Antigene stammen vom Vater. Das Vorkommen von anti-fetalen, anti-plazentaren und anti-paternalen Antikörpern im Serum gesunder Schwangerer beweist, dass eine Erkennung der fetalen Antigene durch das mütterliche Immunsystem die Schwangerschaft nicht beeinträchtigt (Billington 1992), sondern funktionelle Veränderungen induziert, die ein Überleben und die Entwicklung des Fetus erlauben. Trophoblasten exprimieren keine klassischen Major-Histocompatibility-Complex (MHC) Klasse Ia und II Moleküle, sondern dafür ein spezielles MHC Ib-Antigen, das Human-Leucocyte-Antigene G (HLA-G), welches die zytolytische Aktivität von NK-Zellen hemmt. Dieses HLA-G wird hauptsächlich auf extravillösen Trophoblastzellen exprimiert, die in direktem Kontakt mit mütterlichen immunkompetenten Zellen stehen (Rieger et al. 2001). Somit präsentieren Trophoblasten keine paternalen Antigene und sind folglich durch eine T-zellvermittelte Lyse nicht gefährdet (Geis und Dietl 2001). Doch eine Erkennung der Schwangerschaft durch das Immunsystem ist notwendig für einen normalen Schwangerschaftsverlauf. Ungenügende immunologische Reaktionen auf den alloenen Embryo können in einem Schwangerschaftsverlust enden (Gruber und Huber 2005). Der Fetus selbst kommt nicht in direkten Kontakt mit mütterlichem Gewebe, sondern die embryonischen Trophoblasten bilden die Grenzfläche zwischen mütterlichen und fetalen Kompartimenten. Somit müsste der Trophoblast die Region darstellen, an der die fetale Antigen-Präsentation stattfindet (Szekeres-Bartho et al. 2001a). Da Trophoblasten aber kein MHC exprimieren, spielen hierbei $\gamma\delta$ -T-Zellen eine wichtige Rolle in der Erkennung fetaler Antigene. $\gamma\delta$ -T-Zellen erkennen unprozessierte fremde Antigene ohne MHC-Restriktion (Mincheva-Nilsson 2003). Normalerweise machen sie nur etwa 1-10% der T-Zellen aus. Im peripheren Blut gesunder Schwangerer sind die $\gamma\delta$ -T-Zellen signifikant erhöht und exprimieren Progesteronrezeptoren (PR) (Polgar et al. 1999). In der Dezidua der Frühschwangerschaft sind über 60% der T-Zellen $\gamma\delta$ -TCR+ und mehr als 90% dieser Zellen exprimieren PR (Poehlmann et al. 2006). Die Expression von PR ist ein Marker für ihren Aktivitätszustand. Die Aufgabe dieser aktivierten T-Zellen liegt in der Verteidigung gegen Infektion und eine übermäßige

Trophoblastinvasion und sie sind an der Modulation des lokalen mütterlichen Immunsystems beteiligt, die auf ein „Nichtreagieren“ auf den semi-allogenen Fetus abzielt (Poehlmann et al. 2006).

Ein wichtiges Enzym bezüglich der Immunsuppression in der Plazenta ist die Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), welche vom Synzytiotrophoblasten gebildet wird (Aagaard-Tillery et al. 2006). Dieses Enzym katabolisiert Tryptophan, das für die Aktivierung von T-Zellen erforderlich ist. Somit wird die mütterliche T-Zell-Aktivität und Proliferation supprimiert. Eine zu geringe Produktion von IDO könnte mit Schwangerschaftsverlusten assoziiert sein.

Die Schwangerschaft – ein Th2-Phänomen

Die Schwangerschaft wurde erstmals von Wegmann als ein Th2-Phänomen beschrieben, das durch einen Shift in Richtung der weniger schädigenden, anti-inflammatorischen und Antikörper-stimulierenden Th2-Zytokine gekennzeichnet ist (Wegmann et al. 1993). Lokale Veränderungen der Th1-/Th2-Zytokinbalance sind während der Schwangerschaft im Uterus und in der fetoplazentaren Einheit zu beobachten. Diese Veränderungen sind für eine erfolgreiche Implantation, Plazentaentwicklung und das Überleben des Fetus bis zum Schwangerschaftsende unabdingbar (Dealtry et al. 2000).

Zytokine sind Polypeptidhormone und Wachstumsfaktoren, die viele zelluläre Prozesse regulieren. Das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zytokinen spielt in der Schwangerschaft eine bedeutende Rolle. Sie werden von vielen mütterlichen und fetalen Zellen im Uterus und in der fetoplazentaren Einheit produziert (Dealtry et al. 2000). Th1-Zytokine (z.B. TNF- α , IFN- γ , IL-2, -12 und 18) induzieren eine zellvermittelte Zytotoxizität und inflammatorische Reaktionen, assoziiert mit aktivierten Makrophagen, während Th2-Zytokine, wie IL-4, -5, -6, -10 und -13, eine humorale Immunantwort vermitteln, die mit aktivierten Mastzellen und Eosinophilen assoziiert ist. Eine deziduale Produktion von Th2-Zytokinen wie IL-4, IL-10 und TGF- β fördert die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft in frühen Schwangerschaftsstadien, während eine Dominanz von Th1-Zytokinen wie TNF- α , IFN- γ , IL-1 oder IL-12 zum Abort führt (Joachim et al. 2003). Th1-Zytokine können zu Aborten, Wachstumsstörungen, Störungen der embryonalen Entwicklung, sowie zu einer Störung des Wachstums und der Funktion der Trophoblasten führen (Geis und Dietl 2001). Th2-Zytokine dagegen scheinen für eine erfolgreiche Implantation und Trophoblastinvasion notwendig zu sein (Nieuwenhoven et al. 2003). Andere Gruppen vermuten während der Implantation eher eine Th1-Dominanz. Hunt et al. konnten eine Expression von TNF- α in der Implantationsphase feststellen (Hunt et al. 1997). So scheint während der Peri-

Implantationsphase ein lokales proinflammatorisches Milieu für eine optimale Invasion notwendig zu sein (Joachim et al. 2003). Sobald die Plazentaentwicklung beginnt und fortlaufend bis ins 3. Trimester, ist ein lokaler Th2-Shift zu beobachten (Dealtry et al. 2000). Gegen Ende des 3. Trimesters werden Th2-Zytokine herunterreguliert, Th1-Zytokine (z.B. IFN- γ und TNF- α) dominieren und sind an der Einleitung des Geburtsvorganges sowie dem Immunschutz von Mutter und Kind beteiligt (Dealtry et al. 2000).

Durch die verminderte zellvermittelte Immunität ist die Inzidenz viraler Infektionen und Tumoren in der Schwangerschaft höher (Szekeres-Bartho et al. 2001b). Dagegen zeigen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Vaskulitiden und Kollagenosen, die sonst mit immunsuppressiven Medikamenten behandelt werden, während einer Schwangerschaft oft Milderungen (Geis und Dietl 2001).

1.3 Progesteron – das Schwangerschaftshormon

Es wurden bereits verschiedene Mechanismen diskutiert, mit deren Hilfe der Embryo der Abstoßung durch das mütterliche Immunsystem entgehen kann (Sedlmayr et al. 2005 und Trowsdale et al. 2006). Die fetoplazentare Einheit ist durch den Anteil an väterlichen Genen ein „Semi-Allograft“. Folglich kommt es zu einer Immunreaktion der Mutter auf die allogene Schwangerschaft (Druckmann et al. 2005). Progesteron, das wichtigste Schwangerschaftshormon, ist hierbei von großer Bedeutung, denn es schafft eine adäquate immunologische Umgebung für den Embryo und ist somit essentiell für den Erhalt der Schwangerschaft (Stites et al. 1983b und Piccinni et al. 1995). Zu Beginn der Schwangerschaft, bis etwa zur 7.SSW, wird Progesteron im Corpus luteum gebildet. Hormone wie β -HCG, welches vom Trophoblasten gebildet wird, halten die Progesteronproduktion während der Frühschwangerschaft aufrecht (Spencer und Bazer 2004). Danach übernimmt die Plazenta die Synthese. Während des Dezidualisationsprozesses differenzieren sich, als Antwort auf Progesteron, stromale Zellen in deziduale Zellen (Dunn et al. 2003).

Ist nicht genügend Progesteron vorhanden, z.B. nach Ovariectomie oder Behandlung mit dem Progesteronantagonisten RU486, führt dies zum Abort (Porstmann und Arck 2005). Progesteron agiert während der Schwangerschaft als ein natürlicher Immunsuppressor (Stites und Siiteri 1983a) und reduziert die immunologischen Reaktionen maternaler Lymphozyten *in vitro* (Salomon et al. 2005). Die Immunmodulation durch Progesteron ist einer der

Mechanismen, die für einen normalen Schwangerschaftsverlauf essentiell sind (Szekeres-Bartho et al. 1997b).

Progesteronrezeptoren in der Schwangerschaft

In der Schwangerschaft ist die Sensitivität von Lymphozyten gegenüber Progesteron 100-fach erhöht. Dies spricht für eine Hochregulierung von Progesteronrezeptoren (PR) während der Schwangerschaft. Kimoto et al. konnten die mRNA für den Progesteronrezeptor in menschlichen Lymphozyten demonstrieren (Kimoto 1998). Bei Frauen mit rezidivierenden Aborten fand man eine signifikant niedrigere Expression von PR auf Lymphozyten, so dass man einen Zusammenhang zwischen dem Level der PR-Expression von Lymphozyten und dem Verlauf der Schwangerschaft vermuten kann (Szekeres-Bartho et al. 2001b). Mutationen im PR-Gen könnten auch zu einer verschlechterten Reproduktionsfunktion beitragen und folglich zu frühen Aborten führen (Szekeres-Bartho und Balasch 2008). Dies wird auch durch die Ergebnisse von Chiu et al. bestätigt, der eine erhöhte Expression von PR in peripheren Lymphozyten Schwangerer nach einer Immuntherapie bei habituellem Abort feststellen konnte (Chiu et al. 1996). Die Expression von PR auf Lymphozyten erfordert deren Aktivierung. Da man bei Transplantationspatienten ebenfalls eine hohe Progesteronrezeptor-Expression fand (Szekeres-Bartho et al. 1989a), liegt die Vermutung nahe, dass die PR-Expression in der Schwangerschaft durch die Stimulation allogener fetaler Antigene induziert wird (Szekeres-Bartho et al. 2001b). Nach der Erkennung fetaler Antigene entwickeln $\gamma\delta$ -T-Zellen und CD 56+ deziduale Zellen Progesteron-Rezeptoren. Die Bindung von Progesteron an die Rezeptoren führt zur Synthese eines Proteins, genannt Progesteron-induzierter Blockierfaktor (PIBF). Die immunologischen und anti-abortiven Effekte von Progesteron werden durch PIBF vermittelt (Szerey et al. 1997).

1.4 PIBF – Progesteron-induzierter Blockierfaktor

PIBF war ursprünglich als ein 34 kDa großes Protein entdeckt worden, welches unter dem Einfluss von Progesteron von Lymphozyten gesunder Schwangerer freigesetzt wird (Szekeres-Bartho et al. 1985). PIBF besitzt immunmodulierende Effekte *in vivo* und *in vitro*.

PIBF – ein essentieller Faktor in der Schwangerschaft

PIBF hat einen anti-abortiven Effekt in Mäusen (Szekeres-Bartho et al. 1997a), beeinflusst das Th1/Th2-Gleichgewicht *in vitro* und *in vivo*, indem es durch ein Th2-dominantes Zytokinprofil zu einer verminderten zellvermittelten Immunantwort während der Schwangerschaft beiträgt (Szekeres-Bartho und Wegmann 1996) und ist außerdem in der Lage, die NK-Zell-Aktivität über verschiedene Mechanismen zu inhibieren.

Der immunologischen Erkennung der Schwangerschaft folgt eine Aktivierung des mütterlichen Immunsystems. Diese resultiert in einer Hochregulierung von Progesteron-Rezeptoren in aktivierten Lymphozyten (Hudic et al. 2009). Für die Expression von PIBF sind suffiziente Level von Progesteron nötig (Kalinka et al. 2005). Sind diese vorhanden, so produzieren T-Lymphozyten, vorrangig $\gamma\delta$ TCR+ und CD8+ T-Zellen (Szekeres-Bartho und Wegmann 1996), und CD 56+ Zellen (Druckmann et al. 2005) gesunder schwangerer Frauen PIBF (Szekeres-Bartho et al. 1985).

PIBF hemmt die Aktivität von NK-Zellen und senkt deren Zytotoxizität

Die Aktivität von NK-Zellen ist ein wichtiger Parameter während der Schwangerschaft. In einer normalen menschlichen Schwangerschaft ist die Aktivität der NK-Zellen signifikant niedriger als in nichtschwangeren Individuen. Idiopathische spontane Aborte sind oft mit einer erhöhten NK-Aktivität assoziiert (Szekeres-Bartho et al. 2001b). PIBF inhibiert die Aktivität der NK-Zellen *in vivo* und *in vitro*.

Während des 1. Trimenons sind ca. 70% der immunkompetenten Zellen CD45+ Leukozyten und davon ca. 46% NK-Zellen (Poehlmann et al. 2006). PIBF ist in der Lage, die Perforin-Freisetzung von aktivierten peripheren NK-Zellen zu blockieren, wodurch diese die Zielzellen nicht mehr lysieren können (Faust et al. 1999). Die Gruppe um Laskarin et al. fand heraus, dass Progesteron und PIBF die Zytotoxizität dezidualer Lymphozyten supprimieren (Laskarin et al. 2002).

Weiter wird die Aktivität der NK-Zellen durch ein verändertes Zytokinprofil reguliert. PIBF hemmt die IL-12 Synthese aktivierter Lymphozyten. Bei Frauen mit rezidivierenden Aborten und einer hohen NK-Zell-Aktivität wurde eine erhöhte Produktion von IL-12 peripherer Lymphozyten, sowie niedrige Level an IL-10 und PIBF gefunden (Szereday et al. 1997).

Eine weitere Möglichkeit für PIBF die NK-Zell-Aktivität niedrig zu halten wird über die Beeinflussung des Arachidonsäure-Metabolismus vermittelt. Ein normaler Arachidonsäure-Metabolismus resultiert in einer hohen Produktionsrate von IL-12, welches IFN- γ induziert und die zytolytische Aktivität von NK-Zellen erhöht (Szekeres-Bartho et al. 2001b). Ist ausreichend Progesteron und PIBF vorhanden, wird vermindert Arachidonsäure freigesetzt. PIBF inhibiert Phospholipase A2, was die Freisetzung von Arachidonsäure supprimiert. Die daraus resultierende reduzierte Prostaglandinsynthese führt zu einer verminderten Expression von IL-12 und folglich zu einer erniedrigten zytotoxischen NK-Aktivität (Par et al. 2003).

PIBF beeinflusst die Th1/Th2-Balance

Die Schwangerschaft wird als ein Th2-Phänomen beschrieben (Wegmann et al. 1993), in dem die Immunglobulinsynthese erhöht und die zellvermittelte Immunantwort verringert ist. Sobald die Implantationsphase vollendet ist, verursacht eine anormale Th1-Reaktion auf den Trophoblasten einen frühzeitigen Schwangerschaftsverlust, spontane Aborte und Infertilität (Chaouat et al. 1997). PIBF verändert das Zytokinprofil aktivierter Lymphozyten durch einen Th1/Th2-Shift zugunsten einer Dominanz von schwangerschaftsprotektiven antiinflammatorischen Th2-Zytokinen (z.B. IL-3, IL-4 und IL-10) (Szekeres-Bartho und Wegmann 1996) und reduziert die Produktion von Th1-Zytokinen wie IL-12. Zielzellen von PIBF sind CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, die mit einer erhöhten Produktion von Th2-Zytokinen auf PIBF reagieren. Eine Neutralisierung der biologischen Effekte von PIBF *in vivo* resultiert in einem Th1-Shift, der ein Charakteristikum für frühzeitige Schwangerschaftsverluste ist (Szekeres-Bartho et al. 1997b). Ein Th1-Shift hätte u.a. auch erhöhte Level von IL-12 zur Folge, welches sonst wie oben beschrieben durch PIBF inhibiert wird. Beim HELLP-Syndrom wurden erhöhte IL-12 Level gefunden (Chaouat et al. 1997). Szekeres-Bartho et al. konnten feststellen, dass die Expression von PIBF in peripheren Lymphozyten von Frauen mit Spontanaborten signifikant niedriger ist als bei Frauen mit normalem Schwangerschaftsverlauf. Außerdem war die Menge der PIBF-positiven Lymphozyten positiv mit dem Ausgang der Schwangerschaft korreliert (Szekeres-Bartho et al. 1995).

PIBF vermittelt die Th2-Dominanz über den Jak/STAT-Signaltransduktionsweg

PIBF verändert während der Schwangerschaft das Zytokinprofil aktivierter Lymphozyten zugunsten einer Th2-Dominanz (Szekeres-Bartho und Wegmann 1996). Dies wird über den Jak/STAT-Signaltransduktionsweg vermittelt.

Der Jak/STAT-Signalweg ermöglicht, Informationen extrazellulärer Signalpeptide von der Zellmembran nach intrazellulär zu den Promotoren der Zielgene im Zellkern weiterzuleiten. Hormone, wie Erythropoetin oder Wachstumshormon, sowie Zytokine, wie Interleukine und Interferone, nutzen diesen Signalweg. Er ist einer der wichtigsten Signalwege, die Zytokin-induzierte Antworten vermitteln. Die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne eines Zytokinrezeptors bewirkt die Oligomerisierung der Rezeptoren. Dies bewirkt eine gegenseitige Phosphorylierung und Aktivierung Rezeptor-assoziiierter Jaks (Januskinasen). Aktivierte Jaks phosphorylieren Tyrosin-Reste in den zytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren und rekrutieren STATs (Signal Transducer and Activators of Transcription). Anschließend binden STATs über eine SH2-Domäne an den Rezeptor. Sie werden an bestimmten Tyrosinresten phosphoryliert und dadurch aktiviert und dimerisiert. STATs translozieren in den Zellkern, um dort die Transkription bestimmter Gene zu regulieren. Dazu zählen auch SOCS (Suppressor of cytokine signaling), die eine negative Rückkopplungsschleife darstellen und die Weiterleitung von Zytokinsignalen hemmen. (Pollard und Earnshaw 2007)

Regulierung des Th1/Th2-Zytokinprofil durch PIBF

Die Signalwege von IL-12/STAT4 und IL-4/STAT6 werden durch SOCS negativ reguliert. Die IL-12/STAT4-Signaltransduktion bewirkt ein Th1-dominantes Zytokinprofil, während die IL-4/STAT6-Signalkaskade Th2-Zytokine vermittelt.

Die Gruppe um Kozma et al. konnte demonstrieren, dass PIBF STAT6 aktiviert sowie dessen Translokation in den Zellkern induziert und als weiteres STAT4 inhibiert und somit zu einem Th2-dominanten Zytokinprofil beiträgt. Durch die Bindung von PIBF an den GPI-verankerten PIBF-Rezeptor bildet dieser mit der α -Kette des IL-4-Rezeptors ein Heterodimer. Es folgt die Phosphorylierung des IL-4R α assoziierten Jak1. Dieses wiederum aktiviert STAT6. STAT6 transloziert in den Zellkern und bindet dort an bestimmte DNA-Sequenzen IL-4 assoziierter Gene. In Th2-Zellen ist die IL-4/STAT6 Signalkaskade aktiviert (Kozma et al. 2006).

Weiterhin fanden sie heraus, dass PIBF SOCS3 aktiviert und die IL-12 induzierte Aktivierung von SOCS1 inhibiert. SOCS3 bindet an den IL-12R, hemmt das Signal von IL-12 und damit die STAT4 Phosphorylierung. Folglich wird in Th2-Zellen mit einem hohen Level von

SOCS3 die IL-12 induzierte Aktivierung von STAT4 gehemmt und somit die Produktion von Th1-Zytokinen inhibiert. In Th1-Zellen werden hohe Level an SOCS1 exprimiert. Kozma et al. konnten zeigen, dass die SOCS1-Expression nach PIBF-Behandlung verschwindet (Kozma et al. 2006). Die Abbildung 1.2 zeigt den Signalweg von PIBF, über den die Zytokinbalance reguliert wird.

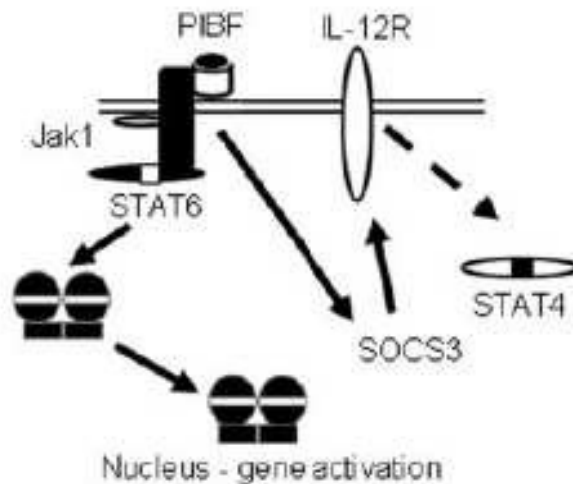


Abb. 1.2 PIBF beeinflusst das Zytokinegleichgewicht über einen neuen Typ des IL-4 Rezeptors

Durch die Bindung von PIBF an den GPI-verankerten PIBF-Rezeptor bildet dieser mit der α -Kette des IL-4-Rezeptors ein Heterodimer. Daraufhin wird Jak1, das mit dem IL-4R α assoziiert ist, phosphoryliert. Anschließend wird STAT6 durch Jak1 aktiviert. Das dimerisierte STAT6 transloziert in den Zellkern und reguliert dort die Transkription verschiedener Gene. Weiterhin induziert PIBF SOCS3. Dieses bindet an den IL-12 Rezeptor und hemmt die Phosphorylierung von STAT4.

PIBF hat einen anti-abortiven Effekt

Spontane Aborte treten bei ca. 15% aller klinisch diagnostizierten Schwangerschaften auf und stellen somit die häufigste Komplikation in der Schwangerschaft dar. Bei 50-60% der Fälle sind z.B. Chromosomenfehler des Fetus, Infektionen, endokrine Dysfunktionen oder das Anti-Phospholipid-Syndrom die Ursache, aber 40-50% bleiben ungeklärt (Druckmann et al. 2005). Von habituellen Aborten spricht man, bei 3 oder mehreren hintereinander aufgetretenen Fehlgeburten vor der 20.SSW ohne bekannte mütterliche oder fetale Pathologie. Habituelle Aborte betreffen ca. 0,5-1% der Paare (Szekeres-Bartho und Balasch 2008). Ursache für habituelle Aborte könnten eine insuffiziente Progesteronsekretion und eine verzögerte Endometriumentwicklung während der Peri-Implantationsphase sein (Szekeres-Bartho und Balasch 2008). Weiterhin wurde eine erhöhte Aktivität zytotoxischer NK-Zellen im Blut von Patienten mit habituellen Aborten mit einer schlechten Prognose für den weiteren Schwangerschaftsverlauf in Verbindung gebracht (Coulam et al. 1995 und Kwak et al. 1995). Raghupathy et al. konnten zeigen, dass eine Therapie mit Dydrogesteron einen Zytokinshift bewirkt, indem es die proinflammatorischen Zytokine hemmt und die antiinflammatorische Zytokinproduktion erhöht (Raghupathy et al. 2007). Studien bei Menschen (Kalinka und Szekeres-Bartho 2005) und Tieren (Joachim et al. 2003) vermuteten, dass die Induktion der PIBF-Produktion der indirekte Mechanismus sein könnte, durch den Dydrogesteron den Schwangerschaftsausgang verbessert.

Szekeres-Bartho et al. konnten demonstrieren, dass eine Neutralisierung der endogenen PIBF-Aktivität in einem Schwangerschaftsabbruch bei Mäusen resultiert (Szekeres-Bartho et al. 1997a). Sie postulierten, dass PIBF einen anti-abortiven Effekt hat, und, indem es die NK-Zell-Aktivität blockiert, für eine erfolgreiche Schwangerschaft bei Mäusen essentiell ist. In trächtigen Mäusen führte die Behandlung mit anti-PIBF-Antikörpern oder dem Progesteron-Antagonisten RU486 zu einer erhöhten Resorptionsrate. Die Resorptionsrate korrelierte mit einer erhöhten NK-Aktivität. Der durch anti-PIBF Behandlung induzierte Schwangerschaftsabbruch konnte durch die Gabe von anti-NK-Antikörpern korrigiert werden. Den NK-Zellen könnte bei der Ursache von Aborten eine Rolle zukommen, indem sie Zytokine produzieren, die anschließend NO-produzierende Makrophagen im Uterus aktivieren, welche eine Schädigung der Zellen bewirken (Szekeres-Bartho et al. 1997a).

Die Abb. 1.3 zeigt schematisch die anti-abortive Wirkung von PIBF.

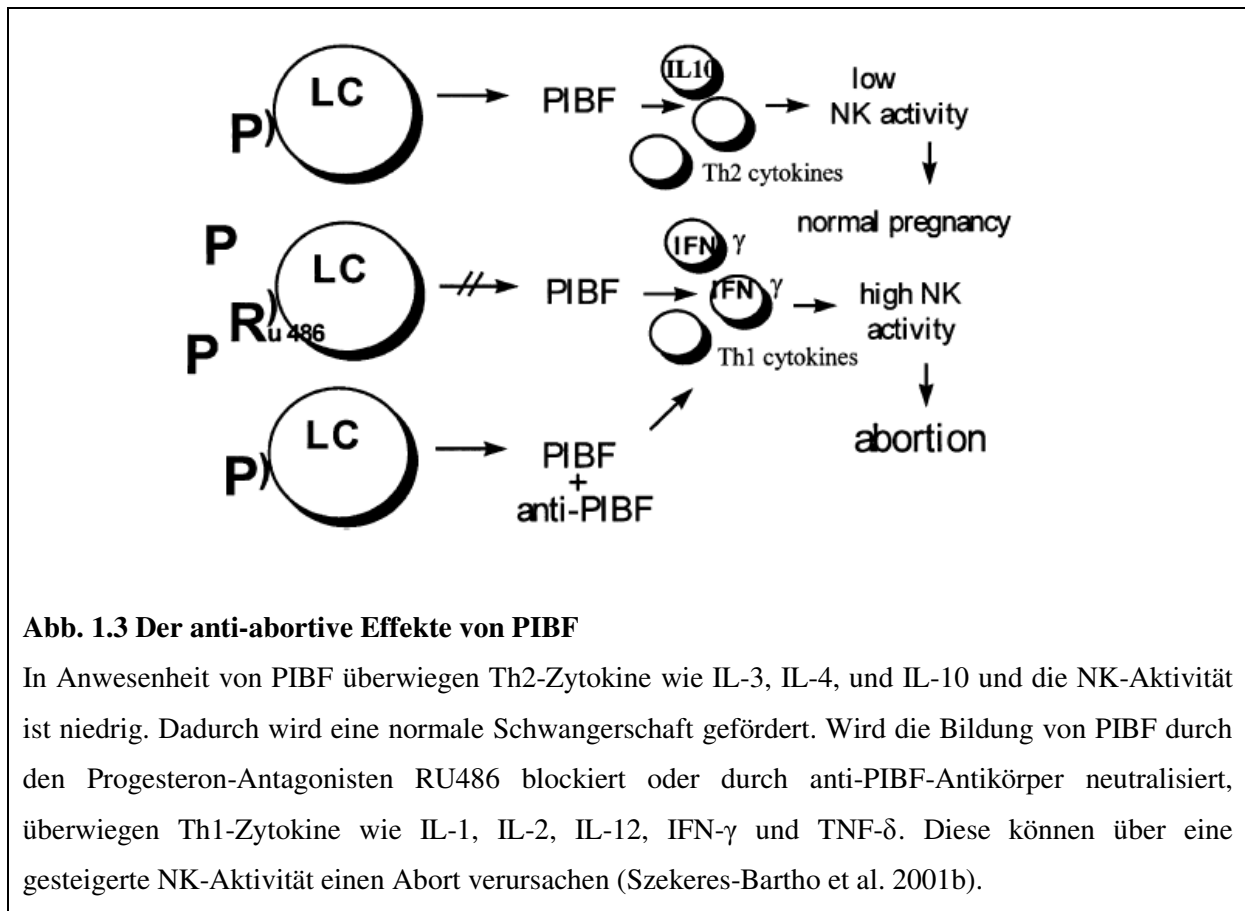


Abb. 1.3 Der anti-abortive Effekte von PIBF

In Anwesenheit von PIBF überwiegen Th2-Zytokine wie IL-3, IL-4, und IL-10 und die NK-Aktivität ist niedrig. Dadurch wird eine normale Schwangerschaft gefördert. Wird die Bildung von PIBF durch den Progesteron-Antagonisten RU486 blockiert oder durch anti-PIBF-Antikörper neutralisiert, überwiegen Th1-Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-12, IFN- γ und TNF- δ . Diese können über eine gesteigerte NK-Aktivität einen Abort verursachen (Szekeres-Bartho et al. 2001b).

1.5 Zusammenfassung der Abfolge der immunologischen Erkennung an der feto-maternalen Grenzfläche

1. Erkennung fetaler Antigene durch $\alpha\gamma$ -T-Zellen der Dezidua
2. Hochregulierung von Progesteron-Rezeptoren auf $\alpha\gamma$ -T-Zellen
3. auf die Bindung von Progesteron erfolgt die Produktion von PIBF
4. Schutz der Schwangerschaft: suffiziente Level von PIBF tragen zu einer erfolgreichen Schwangerschaft bei. PIBF vermittelt seinen anti-abortiven Effekt zum einen über die Th2-Zytokindominanz und zum anderen durch die Reduktion der NK-Zell-Aktivität.

1.6 PIBF – Struktur , Vorkommen und Lokalisation

Struktur und Isoformen von PIBF

Der Gruppe um Polgar et al. gelang es, die Struktur und Sequenz der cDNA, die für PIBF kodiert, zu charakterisieren. Diese kodiert ein hydrophiles Protein mit 757 Aminosäuren, einer alpha-helikalen Struktur und einer Molekularmasse von 90 kDa. Die menschliche Nukleinsäuresequenz von PIBF ist zu 88% homolog zum Maus-PIBF. Das gesamte PIBF-Protein enthält 18 Exons. Das Molekül besitzt eine bZIP-Domäne und einen Leucin-Zipper, die dafür sprechen, dass PIBF als ein Transkriptionsfaktor agieren kann. Außerdem besitzt PIBF ein nukleäres Lokalisationssignal. Der 48 kDa N-terminale Teil von PIBF ist biologisch aktiv, er beeinflusst die NK-Aktivität. Neu synthetisiertes PIBF ist in ruhenden Zellen mit dem Nukleus assoziiert und entspricht dem 90 kDa Protein, welches von der „full-length“ PIBF mRNA kodiert wird. Bei Aktivierung der Zelle werden durch alternatives Splicing auch kleinere Formen produziert. Die kleineren Isoformen besitzen weder die bZIP-Domäne noch das nukleäre Lokalisationssignal (Polgar et al. 2003). Die Abb. 1.4 zeigt die Struktur der 90 sowie der 35 kDa Isoform von PIBF.

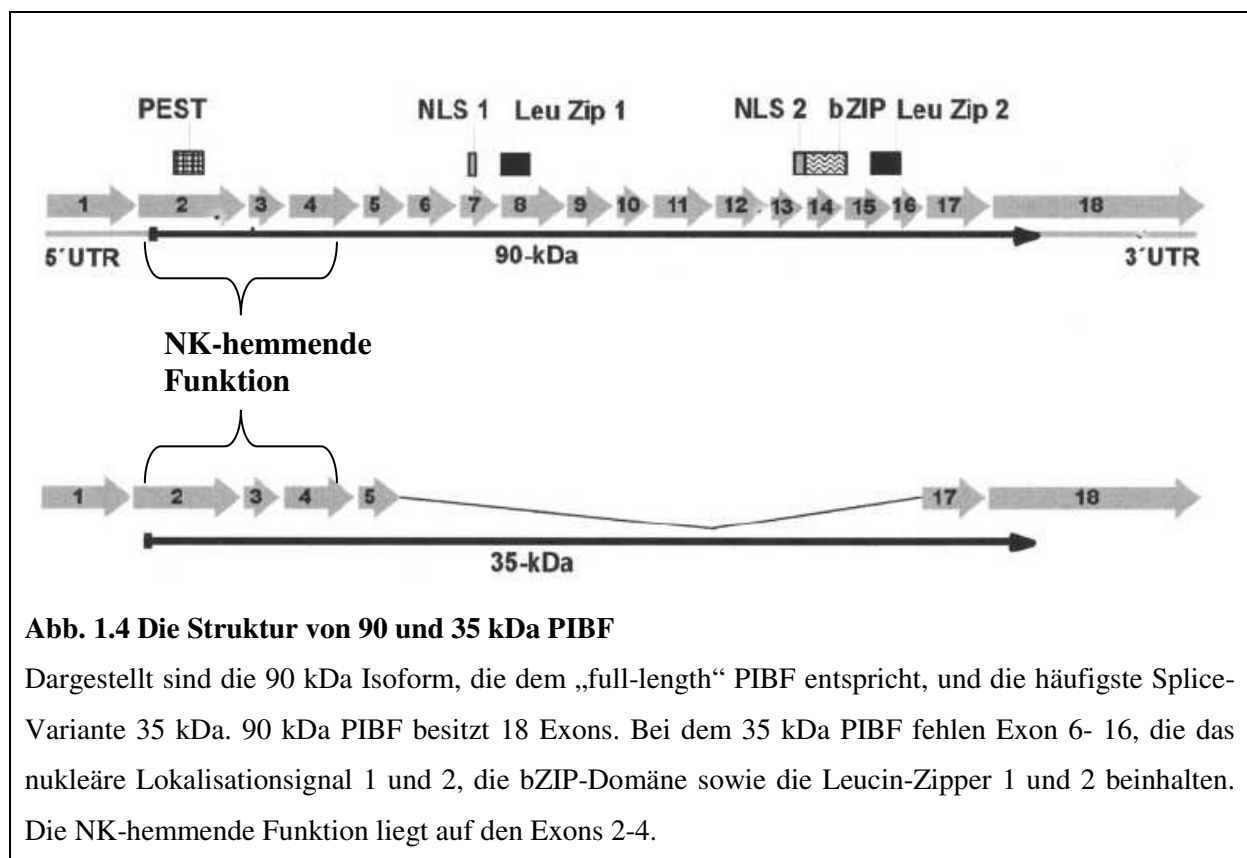


Abb. 1.4 Die Struktur von 90 und 35 kDa PIBF

Dargestellt sind die 90 kDa Isoform, die dem „full-length“ PIBF entspricht, und die häufigste Splice-Variante 35 kDa. 90 kDa PIBF besitzt 18 Exons. Bei dem 35 kDa PIBF fehlen Exon 6- 16, die das nukleäre Lokalisationssignal 1 und 2, die bZIP-Domäne sowie die Leucin-Zipper 1 und 2 beinhalten. Die NK-hemmende Funktion liegt auf den Exons 2-4.

Die 90 kDa Isoform agiert womöglich als Transkriptionsfaktor, während die kleineren Isoformen, wie die 35 kDa Isoform, nach einer Aktivierung der Zelle als Zytokine fungieren (Porstmann und Arck 2005).

Lachmann et al. identifizierten eine 35 kDa Isoform als häufigste Splice-Variante (Lachmann et al. 2004). Dieses 35 kDa PIBF kommt u.a. in der menschlichen- sowie auch in der Maus-Plazenta und im Mausembryo vor (Lachmann et al. 2004). Die beiden dominierenden Formen von PIBF, 90 und 35 kDa, besitzen eine PEST-Sequenz, die für eine kurze Halbwertszeit des Proteins spricht. Zudem enthalten beide Formen die Exons 2-4, denen die NK-hemmende Funktion zugesprochen wird (Polgar et al. 2003).

Inwieweit die ursprünglich entdeckte 34 kDa Isoform der 35 kDa Isoform entspricht, ist noch nicht geklärt. In der Literatur gibt es unterschiedliche Ergebnisse was die Erforschung verschiedener PIBF Isoformen betrifft. So wurde von Anderle et al. publiziert, dass sich die Expression der Isoformen während der Schwangerschaft verändert. Während Erst-Trimester Trophoblasten mehrere Isoformen exprimieren (90, 80 und 40 kDa), exprimieren Trophoblasten am Ende der Schwangerschaft vorrangig die 80 kDa Isoform (Anderle et al. 2007). Dies widerspricht den Ergebnissen von Polgar et al. Diese Arbeitsgruppe fand in Plazenta-Lysaten Isoformen von 65 und 34 kDa (Polgar et al. 2004a). Die 34 kDa Isoform und weitere kleinere Isoformen wurden im Urin gesunder Schwangerer gefunden (Polgar et al. 2004a).

In dieser Arbeit wurde vorrangig die kernassoziierte 90 kDa Isoform, die die häufigste Form von PIBF darstellt, sowie die häufigste Splice-Variante, die aktive zytoplasmatische 35 kDa Isoform, betrachtet.

Vorkommen von PIBF in normalem und malignem Gewebe

Die PIBF cDNA ist ein charakteristisches Merkmal für proliferierende und undifferenzierte Zellen (Polgar et al. 2003) und kommt in normalen Geweben mit hoher Proliferationsrate, wie z.B. fetales Gewebe, Uterus, Plazenta und Testes, sowie in primären Tumoren und Tumorzelllinien, unabhängig vom Vorhandensein von Progesteron-Rezeptoren (PR), vor (Lachmann et al. 2004). In der Schwangerschaft dagegen ist die Produktion von PIBF abhängig von der Induktion von PR auf $\gamma\delta$ -T-Zellen (Szekeres-Bartho et al. 1985 und Szekeres-Bartho et al. 1989b). Primäre Tumore, in denen PIBF nachgewiesen werden konnte, sind u.a. Melanom, Lungentumoren, Kolonkarzinom und Blasenkarzinom (zusammengefasst in Lachmann et al. 2004). Srivastava et al. wiesen PIBF mRNA in Leukämie-Zelllinien

(darunter T-, B- und Myeloid-Zelllinien), in CD 34+ Stammzellen sowie in einer Fibroblasten-Zelllinie und verschiedenen epithelialen Zelllinien nach, während die Expression des PIBF-Proteins begrenzt war. Weiter konnte die Gruppe demonstrieren, dass eine Progesteron-Behandlung die Expression des PIBF-Proteins in PR+ Zellen hochregulieren kann (Srivastava et al. 2007).

Verschiedene Splice-Varianten von PIBF werden sowohl in normalem als auch malignem Gewebe exprimiert, doch scheinen maligne Gewebe, z.B. Mamma-, Uterus- und Magenkarzinom im Vergleich zu ihren entsprechenden normalen Geweben neben einem erhöhten Level an „full length“ PIBF mRNA auch mehr alternative PIBF-Transkripte zu exprimieren (Lachmann et al. 2004).

PIBF-Level in Schwangerschaft vs. Tumor

Während einer normalen Schwangerschaft nimmt die Menge an PIBF bis zur 37. Schwangerschaftswoche kontinuierlich zu, gefolgt von einem starken Abfall nach der 41. SSW. Im Gegensatz hierzu findet man erniedrigte PIBF-Level im Urin pathologischer Schwangerschaften und bei der Präeklampsie (Polgar et al. 2004a). Die Konzentration von PIBF im Urin gesunder nichtschwangerer Personen beträgt etwa 1-10 ng/ml, die von gesunden Schwangeren beträgt ca. 100-300 ng/ml, während bei Patienten mit malignen Tumoren Konzentrationen von 100-1000 ng/ml gemessen wurden (Kozma et al. 2006). Die Menge von PIBF in Körperflüssigkeiten wie Blut oder Urin korreliert mit der Tumorgroße und sinkt postoperativ unter den Cut-Off-Wert (Polgar et al. 2004b). Somit scheint PIBF ein geeigneter Marker für das Monitoring des Therapieerfolges sowie eine Rezidiverkennung zu sein. Auch die Gruppe um Micsik et al. fand signifikant höhere PIBF-Level im Urin von Patienten mit Pankreaskarzinomen (Micsik et al. 2006). Die Veränderungen der PIBF-Konzentration in Körperflüssigkeiten könnten als ein Indikator für das Befinden des Embryos und der Prognose des Schwangerschaftsverlaufs dienen und ebenso in der Tumorthherapie von Bedeutung sein.

Chromosomale Lokalisation von PIBF

Lokalisiert ist PIBF auf Chromosom 13q21-q22. Somatische Deletionen dieser Region wurden bereits in verschiedenen Tumoren, wie im sporadischen (Larramendy et al. 2000) und hereditären (Kainu et al. 2000) Mammakarzinom, im Prostatakarzinom (Dong et al. 2000) sowie im Hepatoblastom (Gray et al. 2000) gefunden. Dies deutet darauf hin, dass diese Region bei der Krebs-Prädisposition und Progression eine Rolle spielt (Rozenblum et al.

2002). Rozenblum et al. vermuteten, dass PIBF möglicherweise eine Bedeutung für die Prädisposition von Mammakarzinomen und für die Krebsprogression hat. Sie untersuchten das PIBF1-Gen auf Mutationen in Familien mit Mammakarzinom, konnten aber keine Frameshifts oder Nonsense-Mutationen finden (Rozenblum et al. 2002). Eine von Ng et al. durchgeführte DNA-Sequenzanalyse bei Patienten mit familiärer chronisch lymphatischer Leukämie, zeigte auch hier keine Frameshifts oder Nonsense-Mutationen im PIBF1-Gen (Ng et al. 2007).

Zentrosomale Lokalisation von PIBF

Durch immunhistochemische Analysen konnte die Gruppe um Lachmann et al. zeigen, das PIBF-positive Zellen einen stark fluoreszierenden perinukleären Spot aufweisen, der dem 90 kDa Molekül entspricht, während die 35 kDa Isoform eine diffuse zytoplasmatische Färbung verursacht (Lachmann et al. 2004). Bei der Zellteilung wurden 2 sich gegenüberliegende Spots von PIBF im Zellkern gesehen, die die Vermutung nahe legen, dass PIBF mit dem Zentrosom assoziiert ist (Lachmann et al. 2004). Vor jeder Zellteilung findet eine Duplikation des Zentrosoms statt. Danach wandern die beiden Zentrosomen zu den entgegengesetzten Polen der Zelle und bilden dort den Ausgangsort des mitotischen Spindelapparates. Viele Proteine, die eine Rolle bei der Tumorgenese spielen, wie die beiden Tumorsuppressor-Gene BRCA1 (Hsu et al. 1998 und Xu et al. 1999) und p53 (Fukasawa et al. 1996), sind mit dem Zentrosom assoziiert.

1.7 Anmerkung

In dieser Arbeit sollte die Funktion von PIBF in der Chorionkarzinomzelllinie Jar untersucht werden. Nach Abschluss der Experimente stellte sich durch parallel durchgeführte Versuche im Labor heraus, dass es sich bei der Zelllinie nicht um Chorionkarzinomzellen handelt, diese Zellen aber dennoch PIBF produzieren. Ein durchgeführter β -HCG-Test zeigte ein negatives Ergebnis. Eine Chromosomenanalyse am Institut für Humangenetik Jena erbrachte den Verdacht, dass es sich um Mauszellen handelt. Es sind womöglich noch weitere Labore betroffen, da die Zellen von einer internationalen Quelle stammen.

Aus diesem Grund wird die Zelllinie in der vorliegenden Arbeit als „PIBF-produzierende Zelllinie“ (PPZ) bezeichnet.

2. Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Funktion und Regulation von PIBF mithilfe der RNA Interferenz näher zu beleuchten. Dazu sollte die Expression von PIBF mittels RNA Interferenz unterdrückt und in anschließenden funktionellen Untersuchungen der Einfluss des „Knockdowns“ auf die Aktivität der Zellen analysiert werden.

Arbeitsschritte:

- Etablierung eines erfolgreichen „Knockdown“ von PIBF mit verschiedenen Methoden der RNA Interferenz und Evaluierung verschiedener siRNA Sequenzen
- Nachweis des erfolgreichen „Knockdowns“ mittels Western Blot und Immunzytochemie
- Untersuchungen zur Funktion und Regulation von PIBF: Invasion, Migration und Proliferation
- Etablierung eines Zytotoxizitätstests von siRNA transfizierten adhären Zellen und peripheren Spenderlymphozyten
- Vergleich der Expression verschiedener PIBF Isoformen in verschiedenen Zelllinien

Fragestellungen:

- Hat PIBF einen Einfluss auf das Invasions-, Migrations- und Proliferationsverhalten von Zellen?
- Führt die verminderte Expression von PIBF zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Zytotoxizität durch periphere Lymphozyten?
- Ist die Expression der PIBF Isoformen 90 und 35 kDa in kanzerogenen und nicht-kanzerogenen Zelllinien unterschiedlich?
- Gibt es eine Korrelation zwischen dem Invasionsverhalten von Zellen und der Expression der beiden PIBF Isoformen?

3. Methoden

Versuchsdurchführung

Die Experimente wurden im Plazentalabor von Herrn PD Dr. med. Udo R. Markert am Klinikum der Friedrich-Schiller Universität Jena, Abteilung Geburtshilfe und während eines Forschungsaufenthalts an der University of Pecs/Ungarn durchgeführt.

Die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden mehrmals durchgeführt. Im ersten Teil werden die verwendeten Zelllinien beschrieben. Im zweiten Teil werden die durchgeführten Methoden kurz erklärt und es wird auf die Etablierung und genaue Durchführung eingegangen.

3.1 Zelllinien

Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3

Die JEG-3-Zelllinie entstammt einem Chorionkarzinom. Sie wurden von Kohler und Bridson während einer Autopsie aus einer zerebralen Metastase eines Chorionkarzinoms isoliert (Kohler and Bridson 1971). JEG-3 Zellen dienen als Modell für Erst-Trimester-Trophoblasten. Die Zellen wachsen *in vitro* adhärent und als Monolayer. Typisch ist auch die Ausbildung von Zellaggregaten. Intrazellulär weisen sie viele dunkle Granula auf. JEG-3-Zellen produzieren humanes Choriongonadotropin (β -HCG), humanes Chorion-Somatomammotropin und Progesteron (Grümmer et al. 1994). Außerdem können die Zellen aus steroidal Vorstufen Östron und Östradiol synthetisieren. Ihre Verdopplungszeit beträgt etwa 24 h (<http://www.dsmz.de>).

Trophoblast-Zelllinie HTR8/SV40neo

Die nichtkanzerogenen HTR8/SVneo-Zellen wurden von Professor Charles H. Graham (Queen's University, Kingston, ON, Canada) gewonnen (Graham et al. 1993). Sie wurden aus menschlichen extravillösen primären Erst-Trimester Trophoblastzellen isoliert. Diese Trophoblastzellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, welches ein „large T“-Antigen (TAG) vom „simian Virus 40 (SV40)“ enthält. In ihrer Morphologie gleichen sich

Elternzellen und HTR8/SVneo-Zellen, beide besitzen einen epithelialen Charakter und sind Zytokeratin positiv. Die HTR8/SVneo-Zellen exprimieren humanes Choriongonadotropin, während bei der Elternzelllinie HTR8 keine Expression nachgewiesen werden konnte. Außerdem zeigen die transfizierten Zellen eine höhere Proliferationsfähigkeit als ihre nichttransfizierten Elternzellen. HTR8/SVneo-Zellen zeigen in vitro eine mit extravillösen primären Trophoblastzellen vergleichbare Invasivität. Ihre Invasivität lässt sich im Gegensatz zu den extravillösen primären Trophoblastzellen nicht durch TGF- β beeinflussen (TGF- β unterdrückt die Invasivität der primären extravillösen Trophoblastzellen). Ihre Verdopplungszeit beträgt etwa 30 bis 40 h.

Chorionkarzinom-Trophoblast-Hybrid-Zelllinien ACH-3P und AC-1M59

Die Hybridzelllinien ACH-3P und AC-1M59 sind durch Hybridisierung menschlicher Trophoblasten mit JEG-3-Chorionkarzinomzellen entstanden.

Bei den ACH-3P-Zellen handelt es sich um eine Fusion von AC1-1-Zellen, einer HGPRT-negativen Mutante der Chorionkarzinomzelllinie JEG-3, und Erst-Trimester-Trophoblastzellen (12. Schwangerschaftswoche) (Hiden et al. 2007). Sie dienen als Modellzelllinie für Trophoblasten des ersten Trimesters der Schwangerschaft. Die Expression von Trophoblastmarkern wie Zytokeratin-7, Integrinen und Matrix-Metalloproteinasen sowie ihr Invasionsvermögen ähnelt Primärtrophoblastzellen des ersten Trimesters (Hiden et al. 2007).

AC-1M59-Zellen sind ein Subklon von ACH-1P-Zellen. Diese entstanden durch somatische Hybridisierung von AC1-1-Zellen mit Term-Trophoblastzellen (Frank et al. 2000). Die Zelllinie AC-1M59 ist nicht tumorigen.

Diese Zelllinien besitzen genetisches Material und Eigenschaften der Elternzelllinie JEG-3 und zusätzlich weisen sie auch Eigenschaften der zweiten Elternzelle, dem extravillösen Trophoblasten, auf. Die Zellen wachsen adhärent in Einzell-Schichten, sind stark granuliert und haben eine epitheloide Morphologie. Ihre Verdopplungszeit beträgt etwa 50 h (<http://www.dsmz.de>).

Für die Versuche mit den Zelllinien JEG-3, PIBF-produzierende Zelllinie (shSOCS3), HTR8/SVneo, AC-1M59 und ACH-3P wurden Zelllysate freundlicherweise von Levon Khatchaturyan, ebenfalls Doktorand unseres Labors, zur Verfügung gestellt

PIBF-produzierende Zelllinie (PPZ)

Hierbei handelt es sich um eine weibliche Zelllinie von der Maus. Die Zellen wurden leicht positiv für Progesteron getestet, während sie für Prolaktin, Testosteron, Leberenzyme und Schilddrüsenhormone negativ sind. β -HCG wird nicht exprimiert. Sie wachsen adhärent als Monolayer in epitheloidem Verband und können auch Cluster bilden. Sie weisen eine hohe Proliferationsrate auf, ihre Verdopplungszeit beträgt etwa 20 bis 30 h. Nach bisherigen Erkenntnissen handelt es sich am ehesten um eine Granulosazelltumor-Linie.

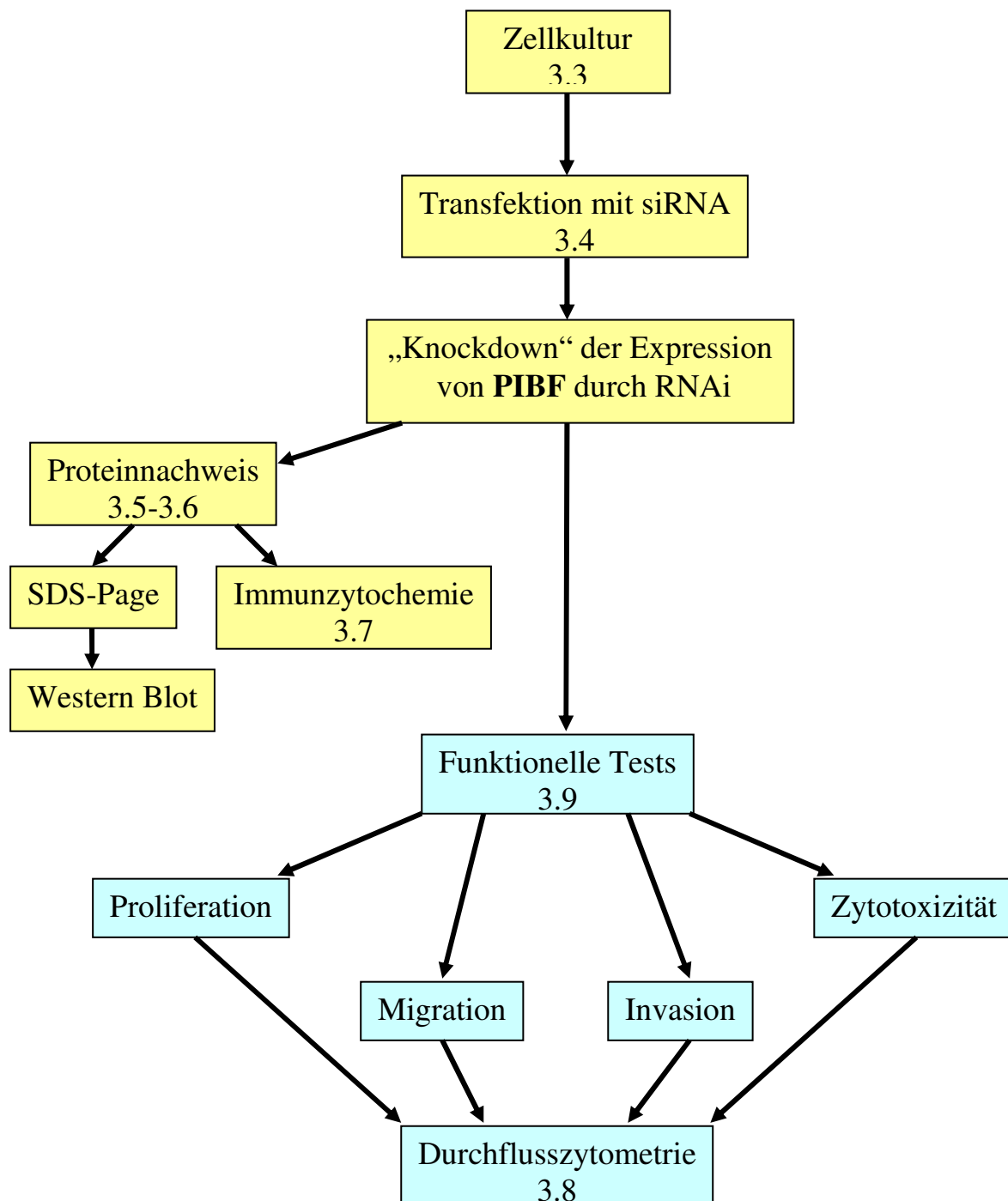
PIBF-produzierende Zelllinie (shSOCS3)

Bei diesen Zellen ist die Expression von SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling 3) durch eine shRNA (short hairpin RNA) – Transfektion unterdrückt.

Lymphozyten aus Vollblut

Lymphozyten wurden aus dem Vollblut von gesunden nichtschwangeren Spenderinnen durch Ficoll-Gradient isoliert und bis zur Verwendung als Effektorzellen im Zytotoxizitätstest in RPMI Medium mit 10% FKS und 2% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

3.2 Methodenübersicht



3.3 Zellkultur

Die PIBF-produzierenden Zellen (PPZ) wurden in DMEM-Medium mit 10% FKS (fetales Kälberserum) und 2% P/S (Penicillin/Streptomycin) unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert (siehe Abb. 3.1) und alle 3 Tage unter sterilen Bedingungen trypsiniert. Hierbei wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen und dann für 5 min mit 500 µl Trypsin im Brutschrank inkubiert. Durch das Trypsin lösten sich die Zellen vom Flaschenboden und konnten dann ausgedünnt werden. Der Rest wurde mit neuem Medium versorgt. Die entnommenen Zellen wurden verworfen oder für Experimente verwendet. Das FKS wurde vor Zugabe zum Medium für 1 h bei 56°C inaktiviert.

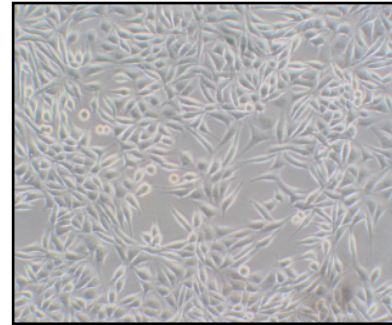


Abb. 3.1 PIBF-produzierende Zellen (PPZ)

3.4 RNA Interferenz

Die RNA Interferenz ist ein Prozess, bei welchem doppelsträngige RNA eine sequenz-spezifische posttranskriptionelle „Stummschaltung“ (Gene silencing) von Genen bewirkt (Elbashir et al. 2001). Entdeckt wurde der Mechanismus der RNA Interferenz erstmals 1990 in Petunien, danach auch in Wirbellosen und in Säugetieren. Es handelt sich hierbei um einen evolutionär konservierten Mechanismus, bei welchem die Funktion der siRNA in der Erhaltung der Genomintegrität, der Verteidigung der Zellen gegen virale Infektionen sowie in der Expressionsregulation zellulärer Gene liegt (Sioud 2005).

Auslöser für die „Downregulation“ von Genen sind RNA-Doppelstränge (dsRNA) (Fire et al. 1998). Diese werden durch ein Enzym, genannt Dicer, ATP-abhängig zerschnitten. Dicer besteht aus einer ATP-abhängigen Ribonuclease, die aus Untereinheiten von RNase III und Helikase aufgebaut ist (Bernstein et al. 2001). So entstehen kleine siRNAs („short interfering“ oder „small interfering“) mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden und einem Überhang von 2 Nukleotiden an jedem 3' Ende, die entscheidend sind für die Erkennung und Degradierung der Ziel-mRNA (Hamilton und Baulcombe 1999). Die RNAi kann ausgelöst werden durch von außen zugeführte siRNAs sowie vom Genom selbst durch microRNAs (miRNA) und short hairpin RNAs (shRNA).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die siRNA in die Zielzellen einzubringen. Synthetische siRNAs entsprechen der durch Dicer zerschnittenen 21-32 Nucleotiden großen siRNAs. Sie müssen mittels Transfektion in die Zielzellen eingeschleust werden. Dafür stehen mehrere Methoden zur Verfügung, z.B. die lipidvermittelte Transfektion, die Mikroinjektion der siRNAs direkt in den Zellkern oder die Elektroporation. Die so in die Zielzellen eingebrachten siRNAs verbinden sich mit dem Enzym Dicer und zellulären Proteinen zu einem Multienzymkomplex. Der Multienzymkomplex wird als RISC (RNA-induced silencing complex) bezeichnet und verfügt über eine Helikase, Exo- und Endonuklease sowie über eine Homologie-suchende Domäne (Sledz und Williams 2005). Durch seine Helikase-Aktivität wird die siRNA entwunden und somit der RISC-Komplex aktiviert (Nykanen et al. 2001). Der zur Ziel-mRNA komplementäre siRNA-Strang paart sich mit diesem. Durch die Nukleaseaktivität des RISC kommt es zur Degradierung der Ziel-RNA. Nun wird das entsprechende Gen, für welches die Ziel-RNA die proteinkodierende Information enthält, nicht exprimiert. Die Proteinsynthese wird somit gehemmt. Dieser Vorgang geschieht posttranskriptionell, d.h. die Transkription des Gens wird nicht ausgeschaltet. In Säugerzellen supprimieren die siRNAs die Genexpression nur für einen kurzen Zeitraum (maximal 7 Tage), da dies u.a. abhängig ist von der Zellproliferation, der siRNA-Dilution und der Halbwertszeit des Ziel-Proteins (Scherr und Eder 2007). Die Abb. 3.2 zeigt einen Überblick über die Schritte der RNA Interferenz.

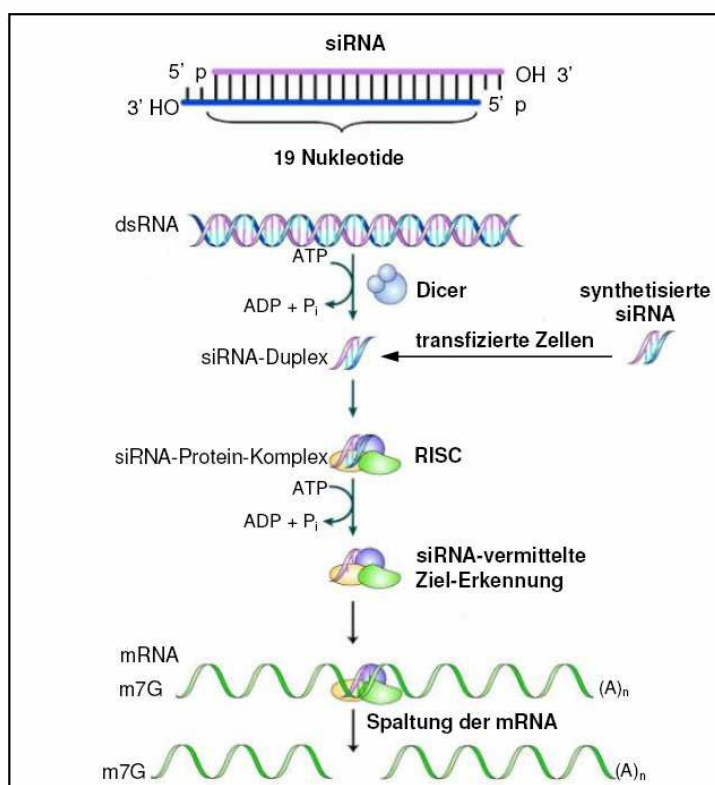


Abb. 3.2 Schematische Darstellung des Mechanismus der RNA-Interferenz

Annealing der Oligonukleotide

Die in Einzelsträngen, Sense und Antisense, vorliegenden Oligonukleotide wurden für die RNA Interferenz zunächst zu Doppelsträngen verbunden. Dazu wurden die Sense- und Antisense-Einzelstränge in Nuklease-freiem Wasser in einer Konzentration von 100µM gelöst. Als nächstes wurden gleiche Mengen von Sense und Antisense in Nuklease-freiem Wasser und 5 x Annealingbuffer gemischt, so dass sich eine Endkonzentration von 10µM ergab. Diese Lösung wurde dann für 1 min bei 95°C und für 1 h bei 37°C inkubiert.

Transfektion von Zellen

Ziel der Transfektionen war es, die Expression von PIBF in den PIBF-produzierenden Zellen (PPZ) auszuschalten. Die Transfektionen wurden mit 5 verschiedenen siRNA-Sequenzen durchgeführt. Die siRNAs 1-3 waren für Mensch, Maus und Rind spezifisch, während die siRNAs 4 und 5 nur für Menschen spezifisch waren. Es wurden unterschiedliche Transfektionsmethoden getestet, zum einen 2 verschiedene Transfektionsreagenzien, Oligofectamin und Nanofectin, und zum anderen die Elektroporation. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einer nicht-genomischen siRNA Sequenz transfiziert wurden, der sog. Scrambled-siRNA (SCR-siRNA). Die Nukleotide dieser siRNA besitzen eine zufällige Reihenfolge und somit keine Zielsequenz im Transkriptom der Zelle. Die SCR-siRNA kann als Negativkontrolle für die Spezifität von siRNA-Effekten dienen. Die scrSTAT3-siRNA wurde für alle Transfektionen als nicht-genomische Kontrolle verwendet.

Transfektion mit Oligofectamin

Für die Transfektion mit Oligofectamin wurden die Zellen in 6-Well-Platten gesät, so dass eine Konfluenz von 30-40% erreicht wurde. Am nächsten Tag erfolgte dann die Transfektion. Dazu wurden die Transfektionsansätze wie folgt zusammengemischt. Es wurden jeweils 10 µl der 10 µM siRNA mit 175 µl Optimum-Mangelmedium und 4 µl Oligofectamin mit 11 µl Optimum gemischt. Diese beiden Ansätze wurden dann zusammengeführt, gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen in der 6-Well-Platte wurden kurz mit Optimum gewaschen, dann wurde pro Well 800 µl Optimum verteilt und die 200 µl Transfektionsansatz wurden vorsichtig und langsam zu den Zellen pipettiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit Oligofectamin behandelt wurden. Nach 4h Inkubationszeit bei 37 °C wurde die Reaktion mit jeweils 500 µl DMEM-Medium (mit 30 % FKS, kein Antibiotikum) abgestoppt. Bei der Durchführung der Transfektion an 2 aufeinander folgenden Tagen, wurden die Zellen nach 24h erneut transfiziert und nach weiteren 24h lysiert. Bei der Analyse verschiedener siRNA-

Sequenz-Mischungen wurde darauf geachtet, die Oligokonzentration von 10µM nicht zu überschreiten, um unerwünschte Wirkungen zu minimieren. So wurden bei der Verwendung aller 5 Sequenzen zusammen je 2µl Oligos verwendet, bei der Mischung aus siRNA 1-3 je 3,33µl und bei siRNA-Mischung 4-5 je 5µl Oligos. Nach 48h wurden die Zellen lysiert und der Erfolg der Transfektion mittels Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese PAGE und Western Blot analysiert.

Transfektion mit Nanofectin

Als weiteres Transfektionsreagenz wurde Nanofectin getestet. Hierfür wurden die Zellen in 6-Well-Platten mit einer Konfluenz von 60-70% gesät. Für die Transfektion wurden auch hier jeweils 2 Transfektionsansätze vorbereitet. Mit diesem Transfektionsreagenz wurde die Effizienz der 5 siRNA Sequenzen-Mischung getestet. So wurden je 2µl der 10 µM siRNA mit 60 µl serumfreiem Medium gemischt und 6 µl Nanofectin mit 60 µl serumfreiem Medium. Diese beiden Ansätze wurden dann sehr vorsichtig zusammen pipettiert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Kontrolle wurden Zellen verwendet, die nur mit Nanofectin behandelt wurden. Nach der Inkubationszeit wurden die Transfektionsansätze vorsichtig zu den Zellen pipettiert. Die Transfektionsreaktion wurde nach 4 h mit DMEM-Medium, welches 30% FKS und kein Antibiotikum enthielt, abgestoppt. Nach 48h wurden die Zellen geerntet und lysiert und der Erfolg der Transfektion mittels Elektrophorese und Western Blot untersucht.

Mikroporation

Weiterhin wurden Transfektionen mittels Mikroporation durchgeführt, eine Art der Elektroporation. Dabei wurden die Zellen in 110 µl Resuspensionspuffer zusammen mit 10 µl 10 µM siRNA resuspendiert und es erfolgte die Elektroporation mit 2 Pulsen bei 1100 V für 35 ms. Bei der Analyse verschiedener siRNA-Sequenz-Mischungen wurde darauf geachtet, die Oligokonzentration von 10µM nicht zu überschreiten. Für die Verwendung aller 5 Sequenzen zusammen wurden je 2µl Oligos verwendet, bei der Mischung aus siRNA 1-3 je 3,33µl und bei siRNA-Mischung 4-5 je 5µl Oligos. Nach der erfolgten Mikroporation wurden die Zellen in 6-Well-Platten mit DMEM-Medium gesät und nach 24, 48 und 72h geerntet. Als Kontrolle dienten Zellen, die ohne siRNA bzw. mit SCR-siRNA elektroporiert wurden.

3.5 Protein-Isolation

Zellyse zur Proteinisolation für SDS-PAGE und Western Blot

Zur Isolation der Proteine aus den Zellen wurden diese zunächst mit PBS (PBS und Proteinase-Inhibitor 1:1000) gewaschen. Dann wurde je 100 µl Zell-Lysepuffer dazugegeben und die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Kulturplatte gelöst. Die Zellen wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und anschließend lysiert durch 3 maliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff sowie Auftauen und Vortexen. Danach wurde 25 min bei 18.000 rpm und 4°C zentrifugiert, die Überstände abgenommen und in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt.

Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode

Mithilfe des Bradford-Tests erfolgte die quantitative Bestimmung von Proteinen. Hierfür wird der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 eingesetzt. Dieser bildet Komplexe mit kationischen und nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten von Proteinen. Durch die Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brillant-Blau G-250 von 465 nm auf 595 nm. Somit erfolgt eine Absorptionsmessung bei 595 nm zur Bestimmung der Proteinkonzentration (Lottspeich 2006).

Durchführung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 5 µl der Zelllysate mit 995 µl Bradford-Solution gemischt und 5 min bei Raumtemperatur und abgedunkeltem Raum inkubiert. Die Absorption wurde in einem Spektrophotometer bei 595 nm gemessen. Parallel wurden Standards mit bekannter BSA-Konzentration gemessen. Mit Hilfe dieser BSA-Lösungen wurde eine Standardkurve erstellt, wodurch sich die Proteinkonzentration der Zelllysate errechnen ließ.

3.6 Proteinnachweis

Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgt eine Auftrennung der Proteine aufgrund ihrer Molekularmasse. Vorher werden die Proteine mit β -Mercaptoethanol vollständig denaturiert. Dies geschieht durch eine Reduktion der Disulfidbrückenbindungen in den Polypeptidketten. SDS (sodium dodecyl sulfate) bewirkt, dass sich auf hydrophobe Wechselwirkungen beruhende Bindungen innerhalb des Proteins lösen und die Proteine in eine linearisierte Form übergehen. Die Proteine besitzen nun eine negative Ladung und wandern entsprechend ihres Molekulargewichts und der angelegten elektrischen Spannung Richtung Anode. Proteine mit kleinerem Molekulargewicht wandern schneller als Proteine mit größerem Molekulargewicht, was zur Auftrennung der Proteine führt.

(Luttmann et al.2006)

Durchführung

Die Expression von Proteinen wurde mittels dieser Methode nachgewiesen. Zunächst wurde das Sammel- und Trenngel entsprechend des Pipettierschemas (siehe Anhang Tab. 1) hergestellt. Für die Gelelektrophorese wurde ein 10,5%iges Gel verwendet und je 20 μ g Protein aufgetragen. Die jeweils bestimmte Proteinmenge wurde mit 5 μ l Auftragspuffer gemischt und bei 95°C 5 min denaturiert. Die Proteine wurden auf dem Gel bei 30 mA in 1 x Laufpuffer aufgetrennt.

Western Blot

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden vom Trenngel auf einen Träger (z.B. eine Nitrozellulosemembran) übertragen und für die nachfolgende Immunodetektion immobilisiert. Hierbei bleibt das Muster der erfolgten Auftrennung der Proteine bestehen. Die Bindung an die Nitrozellulosemembran erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken. Auf der Membran können die Proteine teilweise wieder renaturieren und ihre Sekundär- und Tertiärstruktur, nicht aber ihre Quartärstruktur, einnehmen. Nun können die Proteinbanden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. (Lottspeich 2006)

Durchführung

Die aufgetrennten Proteine wurden nach der Elektrophorese vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Das Gel und die Nitrozellulosemembran wurden aufeinander zwischen mehreren in Blotpuffer getränkten Filterpapieren im Sandwichprinzip auf die Membran transferiert. Dabei wurde darauf geachtet, keine Luftblasen zwischen dem Gel und den Filterpapieren einzuschließen. Das Blotten erfolgte bei 240 mA für 25 min. Mithilfe des Farbstoffes Ponceau S wurden alle Proteine direkt nach dem Blotten unspezifisch markiert, um den Erfolg des Blottens zu beurteilen. Danach wurde die Membran mit 0,8%iger NaOH-Lösung wieder entfärbt. Anschließend erfolgte das Blocken unspezifischer Bindungen auf dem Schüttler mit 5% Skimmed Milk in PBS Tween für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Der Primärantikörper wurde mit 3% Skimmed Milk in TBS Tween 1:1000 verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 4 maligem Waschen für 10 min in PBS Tween wurde die Membran mit einem HRP (Horse-radish Peroxidase)-konjugierten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in 3% Skimmed Milk in PBS Tween für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran 5 x für 5 min in PBS Tween gewaschen. Anschließend wurde das HRP-Substrat auf die Membran gegeben und es erfolgte die Detektion des Chemilumineszenz-Signals auf einem lichtempfindlichen Film oder mithilfe des Geldokumentationsgerät MF-ChemiBIS 3.2.

3.7 Immunzytochemie

Die Grundlage der Immunzytochemie ist die Ausnutzung spezifischer Antigen-Antikörper-Bindungen. Sie findet Verwendung sowohl in der Forschung als auch in der Praxis zur Identifizierung bestimmter Zelltypen, Zellstrukturen oder Zellprodukte. Der Antigen-Nachweis geschieht durch die Sichtbarmachung des Antikörpers z.B mit Fluorochromen. Fluorochrome absorbieren und emittieren Licht bestimmter Wellenlänge. Somit erfolgt die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop (Luttmann et al. 2006). In dieser Arbeit wurde ein fluoreszenzgekoppelter 2. Antikörper verwendet, um die PIBF-Expression nachzuweisen.

Durchführung

Immunzytochemie wurde durchgeführt zum Nachweis der PIBF-Expression der PIBF-produzierenden Zellen. Weiterhin wurde die Methode verwendet um einen erfolgreichen „Knockdown“ von PIBF in den Zellen darzustellen.

Hierzu wurden die PIBF-produzierenden Zellen in DMEM Medium mithilfe von Poly-L-Lysin, verdünnt 1:1000 mit GBSS (Gey's balanced salt solution), auf Objektträger gebracht und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen in 4% Paraformaldehyd für eine Stunde bei 4°C fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Objektträger zweimalig in PBS für je 15 min gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren wurden die Objektträger für 1 h mit 5%igem Ziegen Serum, verdünnt in PBS/Tween 20, und danach 10 min mit Zymed-Blockierlösung geblockt. Der 1. Antikörper anti-48kDa PIBF IgG wurde in einer Verdünnung von 1:100 in PBS/Tween 20 bei 4°C über Nacht auf die Objektträger gebracht. Am folgenden Tag wurde nach dreimaligem Waschen in PBS für je 5 min der 2. Antikörper Anti-Rabbit IgG, der mit dem Fluorochrom Cy3 gekoppelt ist, in einer Verdünnung von 1:400 in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetragen. Nach weiterem dreimaligem Waschen für je 5 min wurden die Zellkerne mit Mounting Medium, welches 1,5 µg/ ml DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid) angefärbt. Die Objektträger wurden dann mit einem Deckgläschen und Nagellack (Yves Saint Laurent Paris, France) verschlossen. Die fertigen Proben wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

3.8 Durchflusszytometrie/FACS (Fluorescent-activated-cell-sorter)

Die Durchflusszytometrie wurde zur Auswertung der Proliferations-, Migrations- und Invasionsassays, sowie zur Messung der Zytotoxizitätsassays verwendet.

Die Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescent-activated-cell-sorter) ist eine hochentwickelte Technologie für die Zählung und Untersuchung und zum Sortieren einzelner Zellen (BDBiosciences 2008) in einem Flüssigkeitsstrom. Anwendung findet die Durchflusszytometrie u.a. bei der Immunophänotypisierung, Ploidie-Analyse, Zellzählung und der GFP-Expressionsanalyse. Das Prinzip der FACS-Messung beruht auf der Emission von optischen Signalen der Zelle. Tausende Zellen passieren pro Sekunde einen Laserstrahl und das Durchflusszytometer detektiert das von jeder einzelnen Zelle reflektierte Licht. Die gesammelten Daten können mit Hilfe der Durchflusszytometrie-Software ausgewertet

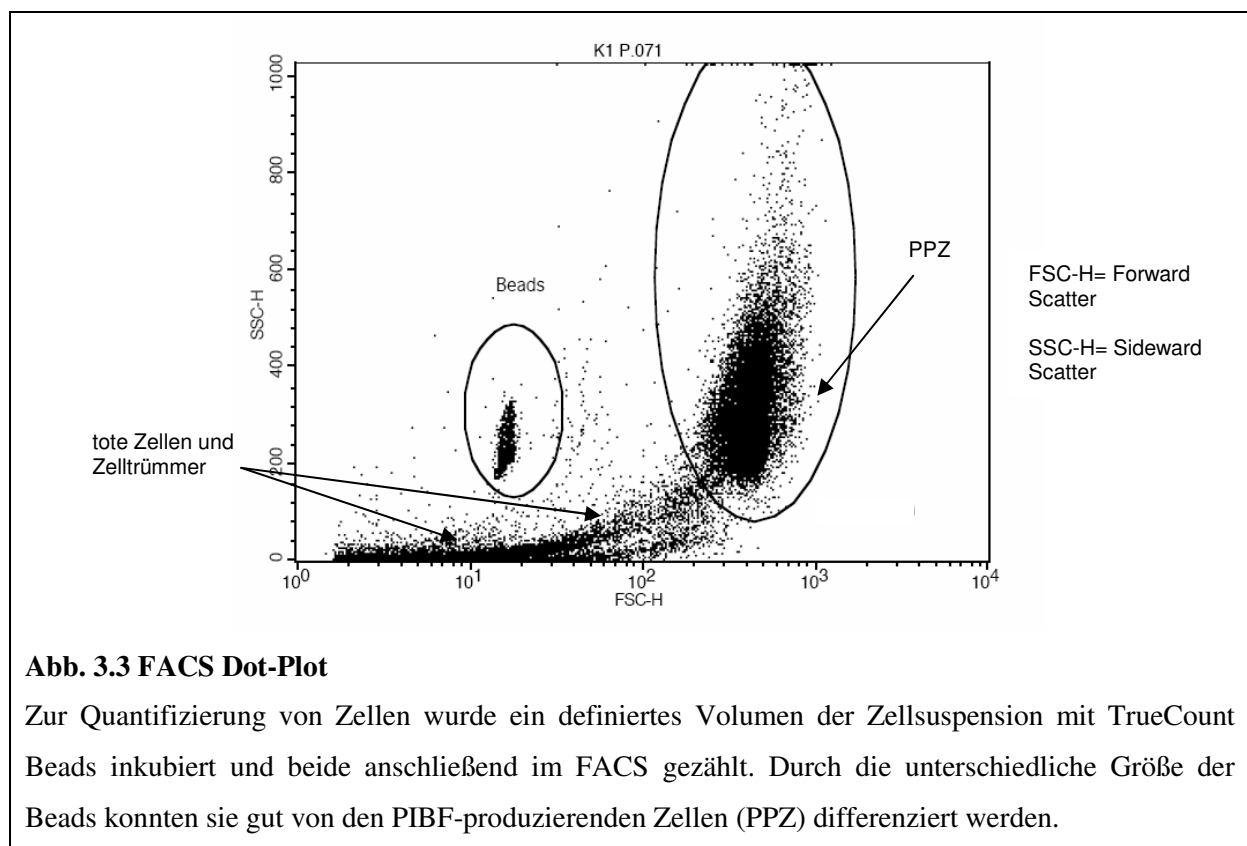
werden, um so Informationen über Größe, Phänotyp, Granularität und Vitalität zu erhalten. Für eine exakte Analyse ist es wichtig, dass die Zellen oder Partikel den Laserstrahl einzeln passieren. Dies geschieht durch hydrodynamische Fokussierung, bei der der Probenstrom so komprimiert wird, dass jede Zelle einzeln durch eine Kapillare gesaugt wird und den Laserstrahl passiert. Ein Teil des Laserlichtes wird von den Zellen gestreut und von Detektoren, sog. Photomultipliern, nachgewiesen. Hierbei ist die Anzahl der detektierten Signale proportional zur Zellzahl. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) detektiert die Menge an Licht, welches von der Zelle nach vorn gestreut wird, wenn sie den Laser passiert. Es ist proportional zur Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter) detektiert Licht, welches in verschiedene Richtungen gestreut wird. Mit dem Seitwärtsstreulicht erhält man Informationen über die Granularität der Zelle sowie über die Größe und Struktur des Zellkernes. Somit lassen sich verschiedene Zellen gut differenzieren. Die Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht die Differenzierung von Zellpopulation und verschiedenen Zellaktivitäten (BDBiosciences 2008). Zu messende Proben können gleichzeitig mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und am FACS analysiert werden, da die Fluoreszenzfarbstoffe über unterschiedliche charakteristische Emissionsspektren verfügen. Propidiumjodid, welches zur Markierung toter Zellen im Zytotoxizitätsassay verwendet wurde, hat ein Emissionsmaximum von 650nm, während CFSE, welches lebende Zellen markiert, ein Emissionsmaximum von 530nm besitzt. (<http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>)

3.9 Funktionelle Analysemethoden

Um den Effekt des „Knockdowns“ von PIBF auf verschiedene zelluläre Funktionen zu analysieren, wurden folgende funktionelle Tests im Vergleich mit Kontrollen durchgeführt.

Auswertung der Proliferations-, Migrations- und Invasionsassays am FACS

Für die Zellzählung am Durchflusszytometer wurden den Proben vor der Messung in PBS gelöste Polystyrolkügelchen (Beads) zugefügt. Diese wurden parallel zu den Proben gemessen und ermöglichten somit, dass bei jeder Probe die gleiche Anzahl an Zellen gemessen wurde. Die Abb. 3.3 zeigt beispielhaft das Bild einer FACS-Messung.



Proliferationsassay

Um das Proliferationsverhalten von PIBF-produzierenden Zellen (PPZ) zu analysieren, wurden die Zellen nach 24 und 48h nach „Knockdown“ von PIBF aus der 6-Well-Platte abtrypsiniert und mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (siehe Abb. 3.4) gezählt. Eine Zellanzahl von 30.000 Zellen wurde in 700µl DMEM Medium mit FKS und Antibiotikum in 24-Well-Platten überführt und für 24h oder 48h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen abtrypsiniert und in ein Probenröhrchen für die anschließende Messung am Durchflusszytometer überführt.

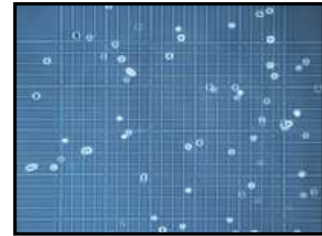


Abb. 3.4 Neubauer Zählkammer

Migrationsassay

Für die Untersuchung der Migration von PPZ mit und ohne „Knockdown“ von PIBF wurden 30.000 Zellen in 300µl DMEM Medium in Inserts gebracht. Diese Inserts wurden in die Vertiefung von 24-Well-Platten eingehängt, denen vorher 400 µl Medium mit FKS und Antibiotikum zugegeben wurde. Die Inserts besitzen einen Boden mit Poren definierter Größe, die eine Migration der Zellen zulassen. Nach einer Inkubationszeit von 24h oder 48h im Brutschrank wurden die Inserts entfernt und nur die Zellen, die in die Vertiefung der 24-Well-Platte migriert waren, abtrypsiniert und in Probenröhrchen für die Durchflusszytometrie überführt.

Invasionsassay

Die Durchführung des Invasionsassays ist ähnlich der Durchführung des Migrationsassays. Zur Untersuchung der Invasion werden die Inserts mit 100 µl MatrigelTM-Lösung, 1:10 verdünnt in serumfreiem DMEM, beschichtet und für 4h im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit geliert das Gel. Es stellt die extrazelluläre Matrix eines *in vivo*-Modells. Zellen mit einem invasiven Charakter können diese Schicht verdauen und in die 24-Well-Platte wandern. Nach 24h oder 48h Inkubationszeit werden die Inserts entfernt und die Zellen, die sich nun in der Vertiefung der 24-Well-Platte befinden, abtrypsiniert und in Probenröhrchen für die Messung am Durchflusszytometer überführt.

Zytotoxizitätstest

Der Zytotoxizitätstest wurde durchgeführt um den Einfluss des „Knockdown“ von PIBF auf die Zytotoxizität von peripheren Spenderlymphozyten zu analysieren. Es wurde durch die Analyse verschiedener Effektor/Target-Verhältnisse sowie verschiedener Inkubationszeiten versucht, den Test für transfizierte PIBF-produzierende Zellen zu etablieren.

Die Zellen wurden mit Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) und Propidiumjodid (PI) angefärbt, damit am Durchflusscytometer zwischen lebenden (CFSE-markiert) und toten (Propidiumjodid-markiert) Zellen unterschieden werden konnte.

Isolierung von Lymphozyten für Zytotoxizitätstest

Für die Durchführung von Zytotoxizitätstests wurden Lymphozyten aus peripherem Blut von gesunden nichtschwangeren Spenderinnen im Alter von 23 bis 27 Jahren isoliert. Dazu wurde das Vollblut aus 5 Monovetten 1:1 mit PBS verdünnt und dann vorsichtig auf 3 ml Ficoll in 15 ml Reaktionsgefäße aufgeschichtet. Anschließend wurde für 20 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Dadurch erfolgte die Auftrennung (siehe Abb. 3.5). In der untersten Schicht befanden sich die Erythrozyten, in der darüber liegenden Schicht das Ficoll und über dem Ficoll war ein weißer Ring zu sehen, in dem sich die Lymphozyten und Monozyten gesammelt hatten. In der obersten Schicht befand sich das Gemisch aus Plasma und PBS. Der weiße Ring aus Lymphozyten wurde vorsichtig abpipettiert und in 50 ml Reaktionsgefäße überführt.

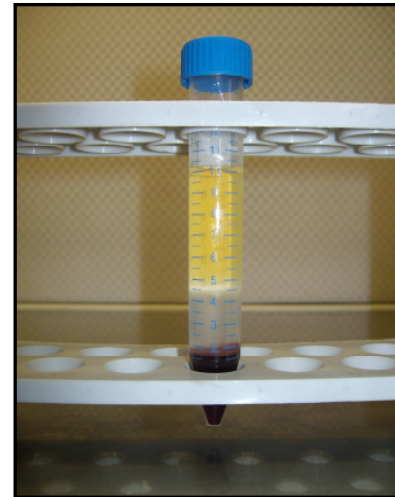


Abb. 3.5
Lymphozytenisolierung

In diesen erfolgten dann 2 weitere Waschschrte in RPMI- Medium nach denen jeweils für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet erneut resuspendiert wurde, um das Ficoll, welches toxisch auf Lymphozyten wirkt, zu entfernen. Zuletzt wurden die isolierten Lymphozyten in RPMI-Medium mit 10% FKS und 2% Penicillin/Streptomycin bis zur weiteren Verwendung als Effektorzellen im Zytotoxizitätstest kultiviert (siehe Abb. 3.6).

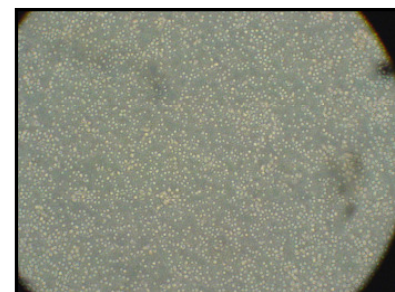
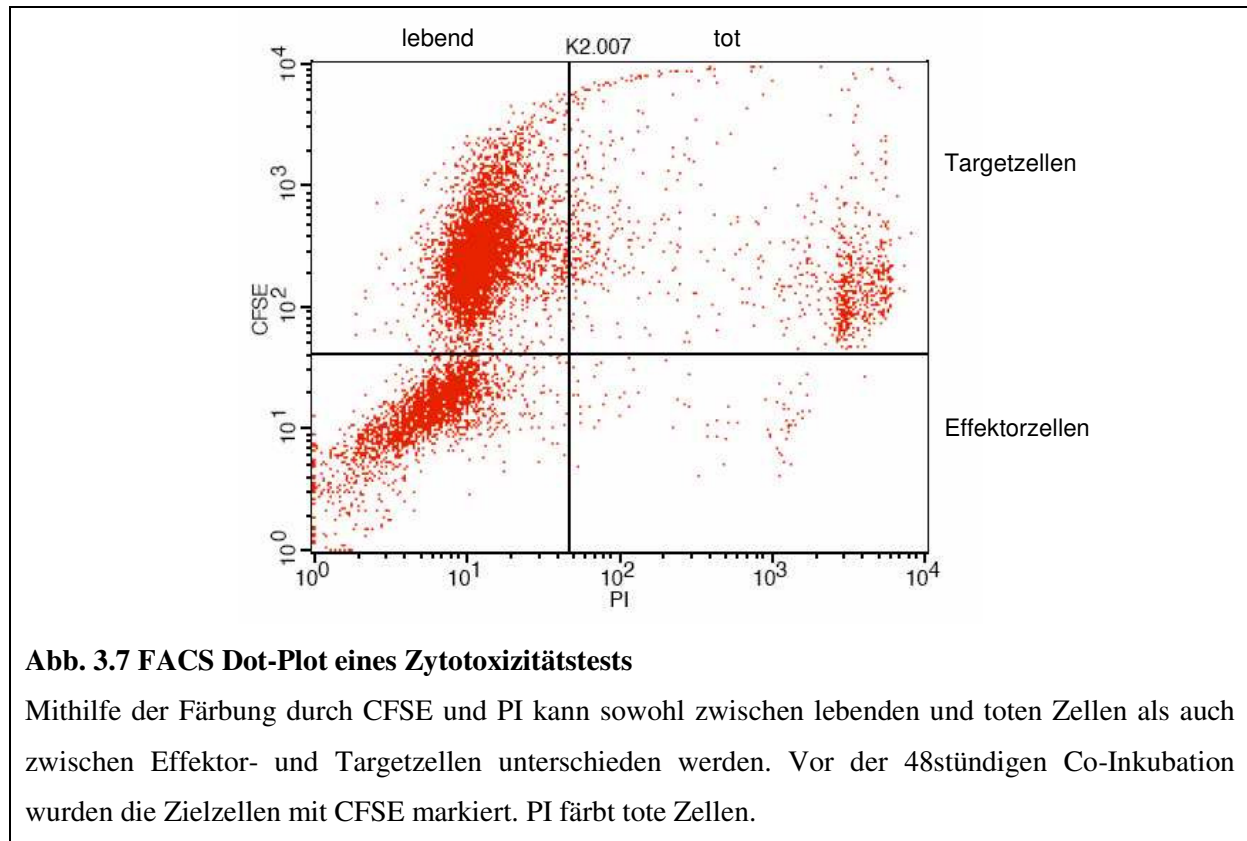


Abb. 3.6
Isolierte Lymphozyten

Durchführung des Zytotoxizitätstests

Am Tag 1 erfolgte die Transfektion der Target-Zelllinie mittels Mikroporation um die PIBF Expression auszuschalten. Nach 24 h wurden die Zellen dann mit CFSE in einer Konzentration von 5µM in serumfreiem DMEM Medium für 20 min bei 37°C angefärbt. Die Reaktion wurde durch Waschen mit Kulturmedium abgestoppt. Die transfizierten und gefärbten Zellen wurden gezählt und je 50.000 Zellen in die Vertiefung einer 24-Well Platte gesät. Pro Transfektion und Kontrolle wurden Duplikate angefertigt, ein Duplikat für den Zytotoxizitätstest und eins für die Bestimmung der natürlichen Todesrate ohne Koinkubation mit Lymphozyten. Am selben Tag wurden Lymphozyten aus peripherem Blut von gesunden Spendern isoliert. Die Lymphozyten sollten als Effektorzellen dienen. Es wurde am nächsten Tag angenommen, dass sich 100.000 Zellen pro Well in der 24-Well Platte befinden. Die Spenderlymphozyten wurden gezählt und in einem Effektor/Target-Verhältnis von 5:1, 10:1 und 25:1 zu den Zellen gegeben. Der Zytotoxizitätstest wurde für 24 h bei 37°C inkubiert. In einer weiteren modifizierten Versuchsreihe wurden die Zellen 24 h nach Transfektion mit CFSE gefärbt, anschließend gezählt und pro Well 100.000 Zellen in eine 24-Well Platte gesät. Nach einer 4 stündigen Wartezeit, in der die Zellen erneut adhärent wurden, erfolgte die Zugabe der Lymphozyten in Effektor/Target-Verhältnissen von 5:1, 10:1 und 25:1 zu den Zellen und die Inkubation für 48 h bei 37°C. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 100µl Propidiumjodid (0,1mg/ml) pro ml Medium angefärbt. Propidiumjodid färbt die durch Lyseaktivität der Effektorzellen freigeswordene DNA der Target-Zellen an und ermöglicht so die Erkennung toter Zielzellen. Die Überstände der Wells wurden in FACS-Röhrchen überführt. Die adhärenen Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, dann abtrypsiniert und ebenfalls in die FACS-Röhrchen überführt. Die Auswertung erfolgte am FACS Calibur mit dem CellQuestPro-Programm. Die Abb. 3.7 zeigt beispielhaft eine Zytotoxizitätsmessung am FACS.



Vor der Messung der Proben erfolgte die Einstellung der Parameter mithilfe ungefärbter, einfach gefärbter (CFSE oder PI) und toter Zellen, die vorher bei -20°C abgetötet wurden.

Die Bestimmung der Todesrate in Prozent erfolgte anhand dieser Formel:

$$\text{Todesrate} = \frac{\text{Anzahl toter Zielzellen}}{\text{Anzahl gesamter Zielzellen (lebende + tote Zellen)}} \cdot 100$$

3.10 Dokumentation und statistische Auswertung

Die Western Blots wurden mithilfe des Geldokumentationsgerätes MF-ChemiBIS 3.2 und der „Gel-Capture“-Software aufgenommen. Danach erfolgte die quantitative Auswertung mit der „Totallab TL100 V2006b“-Software.

Die Messungen am Durchflusszytometer sowie die Auswertung erfolgten mit dem „Cell Quest Pro“-Programm.

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse der Western Blots sowie der funktionellen Tests erfolgte mit dem Programm MS Excel. Aus den Ergebnissen der unabhängigen Einzelexperimente wurden Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler berechnet. Mithilfe des Student's t-Test wurden die Ergebnisse auf ihre statistische Signifikanz geprüft. Diese liegt vor, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner als 0,05 ist.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung der siRNA – Transfektion

Zur Unterdrückung der Protein-Expression mittels siRNA ist eine erfolgreiche Transfektion essentiell. Für die Etablierung der Transfektion der PIBF-produzierenden Zellen (PPZ) wurden 2 verschiedene Transfektionsreagenzien und Elektroporation getestet. Das Ergebnis der Transfektionen wurde mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. Ziel der Transfektionen war ein erfolgreicher „Knockdown“ von PIBF.

Analyse verschiedener Transfektionsmethoden und siRNA-Sequenzen für PIBF

Um die Expression von PIBF in den Zellen zu hemmen, wurden Transfektionen mit 5 verschiedenen siRNA-Sequenzen, spezifisch für PIBF, durchgeführt. Es wurde versucht, die Transfektion für die 5 verschiedenen siRNA-Sequenzen zu etablieren und zu validieren. Während der Etablierungsphase wurde versucht, die optimale Transfektionsmethode für einen effizienten „Knockdown“ von PIBF zu finden. Dabei wurde darauf geachtet, die Konzentration der Oligos nicht zu erhöhen, um toxische Nebenwirkungen auf die Zellen zu vermeiden. Weiterhin wurde versucht, die optimale Methode zu finden, bei der die Viabilität der Zellen so wenig wie möglich beeinflusst wird. Es sollte eine erfolgreiche PIBF-Expressionshemmung beider PIBF-Isoformen, 90 und 35 kDa, erzielt werden, um weitere funktionelle Analysen anzuschließen.

Transfektion mit Oligofectamin

Mithilfe des Transfektionsreagenz Oligofectamin wurden 5 verschiedene siRNA-Sequenzen für PIBF einzeln und zusammen in unterschiedlichen Mischungen analysiert. Mit der Verwendung der Sequenzen einzeln konnte kein erfolgreicher „Knockdown“ erzielt werden. Deswegen wurde versucht, durch eine Transfektion an 2 aufeinander folgenden Tagen eine reduzierte Expression von PIBF zu erreichen. So konnte mit der siRNA 4 die Expression der 35 kDa Isoform um mehr als 70% inhibiert werden, während jedoch die 90 kDa Isoform keine Veränderung zeigte (siehe Abb. 4.1 und 4.2). Dieses Ergebnis erwies sich jedoch sowohl mit der siRNA 4 als auch mit den 4 anderen siRNAs als nicht reproduzierbar. Zudem zeigten auch die mit SCR-siRNA behandelten Zellen eine deutliche Veränderung der PIBF-Expression.

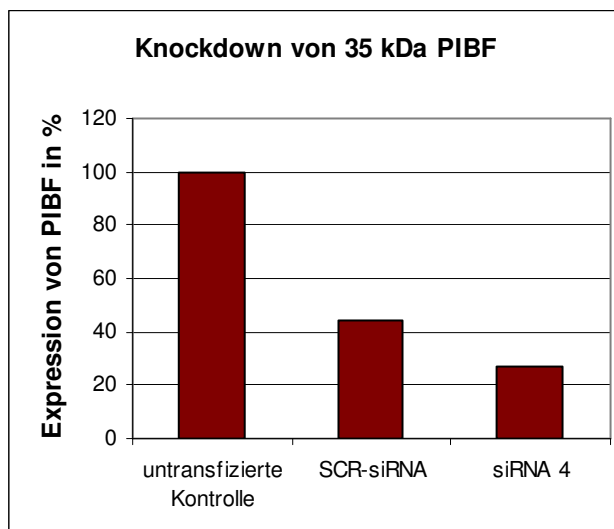


Abb. 4.1 Transfektion mit Oligofectamin an 2 Tagen (n=1)

Die Zellen wurden mit der PIBF-siRNA 4 und einer Oligokonzentration von 10 μ M an 2 aufeinander folgenden Tagen transfiziert, nach 48h lysiert und der Transfektionserfolg mittels Western Blot analysiert. Die untransfizierte Kontrolle wurde = 100% gesetzt. (SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

Transfektion mit siRNA 4 an 2 Tagen

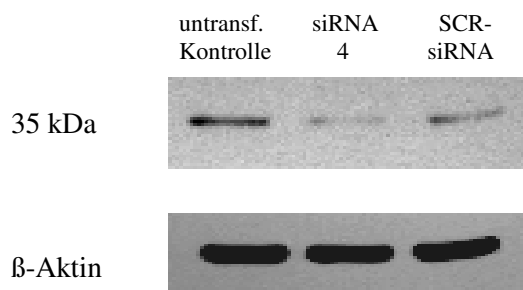


Abb. 4.2 Transfektion von Zellen mit Oligofectamin an 2 aufeinander folgenden Tagen

Der PIBF- und β -Aktin-Nachweis erfolgte mittels Western Blot. β -Aktin diente als Auftragskontrolle. (SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

Während der weiteren Etablierung wurde die Transfektion mit den 5 verschiedenen Sequenzen in unterschiedlichen Zusammensetzungen durchgeführt (siehe Abb. 4.3). Hierbei wurden die Oligos so zusammengemischt, dass die Oligokonzentration 10 μ M nicht überschritt. So konnte die PIBF-Expression der 90 kDa Isoform maximal um mehr als 60% reduziert werden. Die 35 kDa Isoform konnte ebenfalls um bis zu 60% reduziert werden. Doch zeigten auch hier die mit SCR-siRNA behandelten Zellen z.T. Veränderungen der

PIBF-Expression. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde versucht mithilfe weiterer Transfektionsmethoden den PIBF „Knockdown“ zu optimieren.

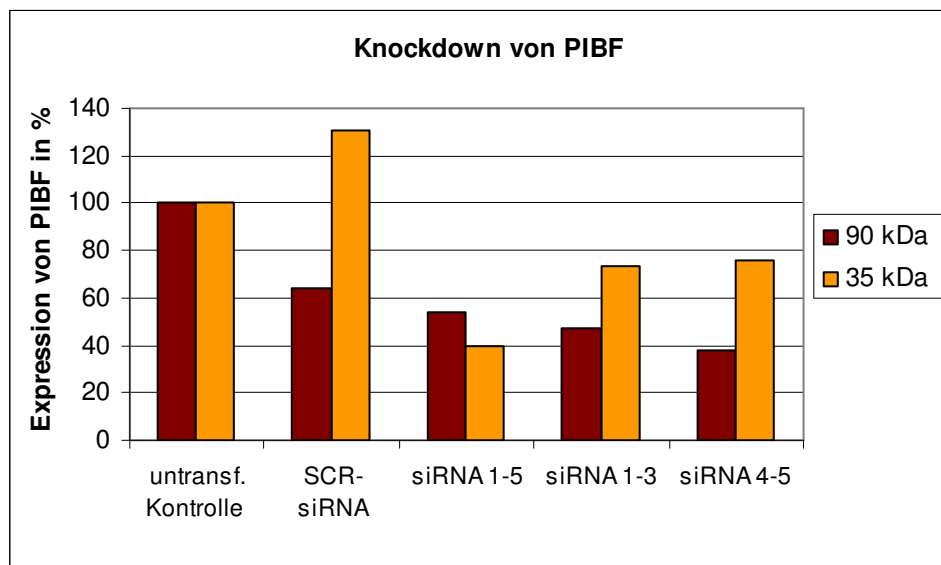


Abb. 4.3 Transfektion von Zellen mit Oligofectamin und verschiedenen siRNA-Mischungen (n=1)

Zellen wurden mit verschiedenen siRNA-Mischungen transfiziert und nach 48h lysiert. Die Oligokonzentration betrug bei allen siRNA-Mischungen 10 μ M. Der Transfektionserfolg wurde mittels Western Blot analysiert. Die untransfizierte Kontrolle wurde = 100% gesetzt.

(SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

Transfektion mit Nanofectin

Die Transfektion mit Nanofectin erzielte einen guten Transfektionserfolg für die Transfektion mit der 5 Sequenzen-Mischung. Die PIBF-produzierenden Zellen wurden 24h und 48h nach Transfektion lysiert und der Erfolg der Transfektion im Western Blot analysiert. Auffallend war aber die erhöhte Sterberate der Zellen nach der Behandlung mit Nanofectin. Durch die Transfektion mit Nanofectin konnte eine Reduktion der 90 kDa Isoform von PIBF auf etwa 36% erreicht werden. Dieses Ergebnis wurde 48h nach Transfektion erzielt (siehe Abb. 4.4). Ein „Knockdown“ der 35 kDa Isoform konnte weder nach 24h noch nach 48h erzielt werden.

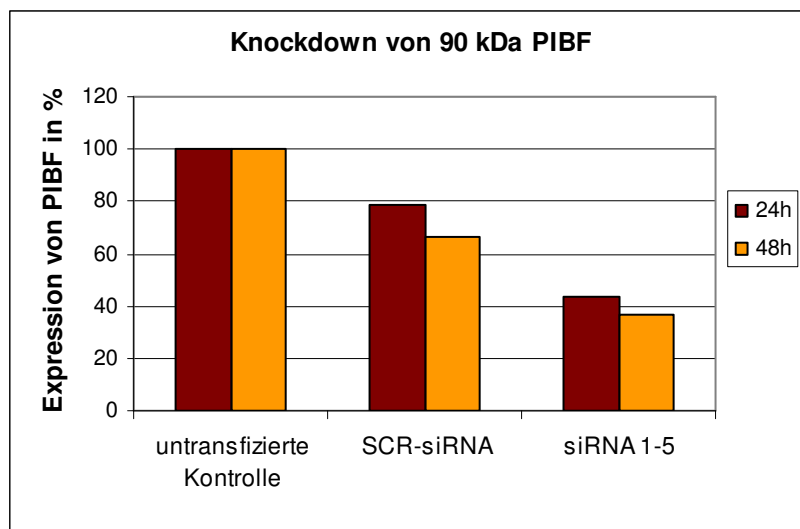


Abb. 4.4 Transfektion mit Nanofectin und der 5 Sequenzen-Mischung (n=1)

Zellen wurden mit der Mischung aus 5 verschiedenen siRNA-Sequenzen transfiziert (Oligokonzentration 10 μ M) und nach 24h und 48h lysiert und der Transfektionserfolg mittels Western Blot analysiert. Die untransfizierte Kontrolle wurde = 100% gesetzt.

(SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

Abb. 4.5 zeigt einen erfolgreichen „Knockdown“ von 90 kDa PIBF nach 24h, während die 35 kDa Isoform keine Veränderung zeigt. Auch mit diesem Transfektionsreagenz zeigten die mit SCR-siRNA behandelten Zellen eine veränderte PIBF-Expression (siehe Abb. 4.4). Aufgrund dessen und wegen der erhöhten Sterblichkeit der Zellen, wurden die weiteren Transfektionen nicht mit Nanofectin durchgeführt.

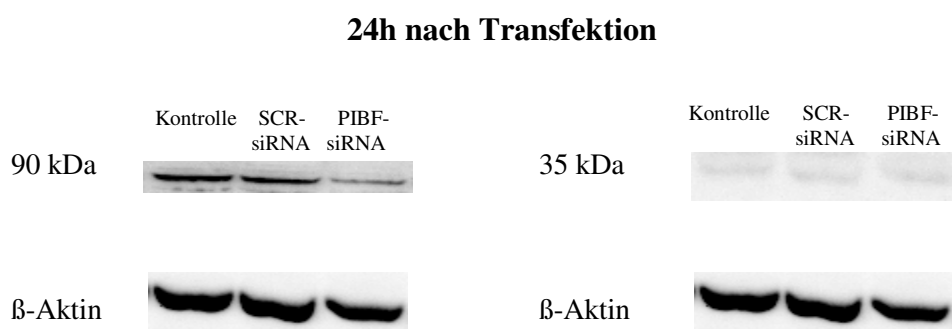


Abb. 4.5 Transfektion mit Nanofectin und der 5 Sequenzen-Mischung

Der PIBF- und β -Aktin-Nachweis erfolgte mittels Western Blot. β -Aktin diene als Auftragskontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse für die Transfektion mit Nanofectin nach 24h. Die 90 kDa Isoform zeigt eine deutliche Expressionsreduktion, während die Expression der 35 kDa Isoform nahezu gleich blieb. (SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

Transfektion mittels Mikroporation

Für die Etablierung der Transfektion mittels Mikroporation wurden die PIBF-produzierenden Zellen mit den 5 siRNA-Sequenzen einzeln und als Sequenzen-Mischung transfiziert.

Die Transfektion mit den einzelnen siRNA-Sequenzen zeigte sehr unterschiedliche Ergebnisse (siehe Abb. 4.6 und 4.7). Die 90 kDa Isoform konnte mit den siRNAs 1 und 3 um mehr als 70% reduziert werden, während die 35 kDa Isoform nur durch die siRNA 4 um ca. 20% reduziert werden konnte. In weiteren Versuchen, in denen probiert wurde durch Transfektion der einzelnen Sequenzen die PIBF-Expression zu hemmen, konnte kein erneuter „Knockdown“ erzielt werden, sowohl nach 48h als auch nach 72h nach Transfektion.

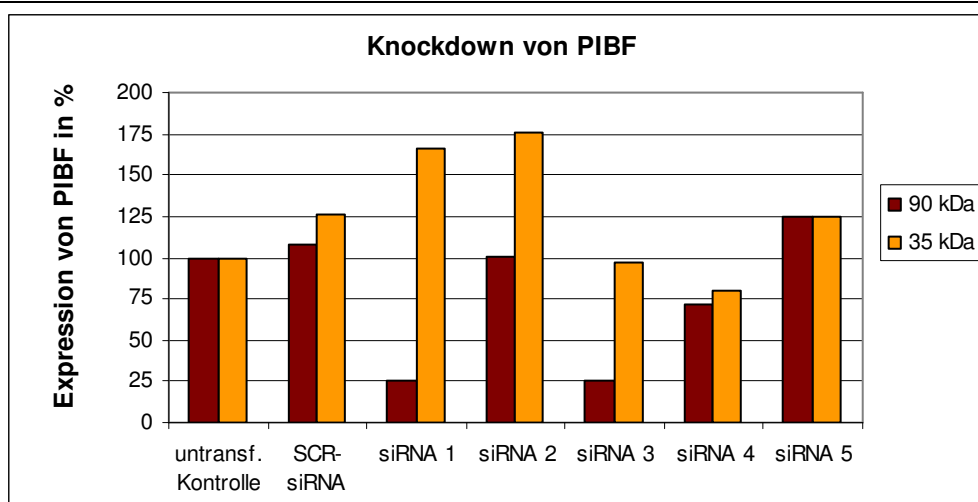


Abb. 4.6 Transfektion von Zellen am Mikroporator mit 5 verschiedenen siRNA Sequenzen für PIBF (n=1)

Zellen wurden mit 5 verschiedenen siRNA-Sequenzen für PIBF transfiziert (Oligokonzentration 10µM), nach 48h lysiert und der Transfektionserfolg mittels Western Blot analysiert. Die untransfizierte Kontrolle wurde = 100% gesetzt. (SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

Transfektion der 5 siRNA-Sequenzen für PIBF einzeln

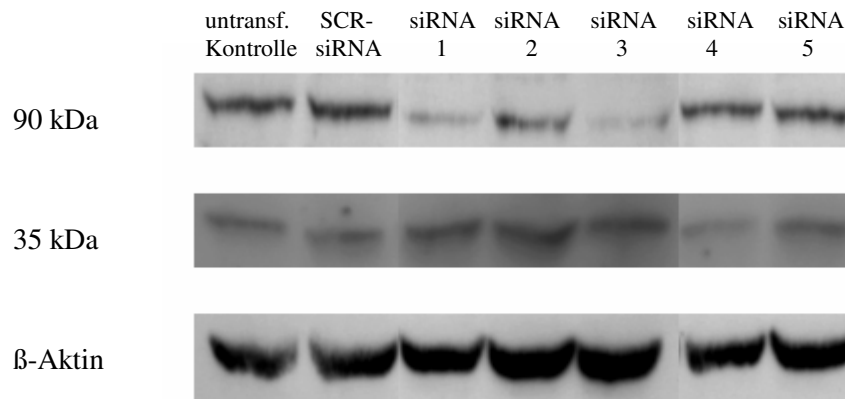


Abb. 4.7 Transfektion von Zellen mit 5 verschiedenen siRNA-Sequenzen für PIBF

Der PIBF- und β -Aktin-Nachweis erfolgte mittels Western Blot. β -Aktin diente als Auftragskontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse für die Transfektion am Mikroporator 48h nach Transfektion. (SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

Aufgrund dessen wurden weitere Transfektionen am Mikroporator mit verschiedenen siRNA-Sequenz-Mischungen analysiert. Hier zeigte die 5 Sequenzen-Mischung das beste Transfektionsergebnis (siehe Abb. 4.8 und 4.9). Die 90 kDa Isoform konnte mit der Mischung aus allen 5 Sequenzen um mehr als 70% gehemmt werden. Die 35 kDa Isoform konnte nur durch die Mischung der 5 Sequenzen um ca. 18% reduziert werden.

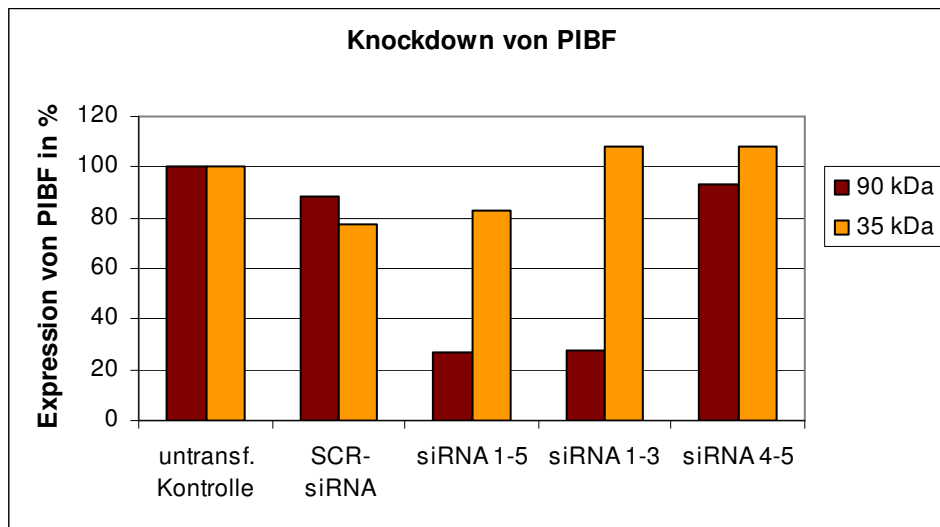


Abb. 4.8 Transfektion am Mikroporator mit verschiedenen Sequenz-Mischungen (n=1)

Zellen wurden mit verschiedenen siRNA-Mischungen transfiziert und nach 48h lysiert. Die Oligokonzentration betrug bei allen siRNA-Mischungen 10µM. Der Transfektionserfolg wurde mittels Western Blot analysiert. Die untransfizierte Kontrolle wurde = 100% gesetzt.

(SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

Transfektion der mit verschiedenen Sequenzen-Mischungen

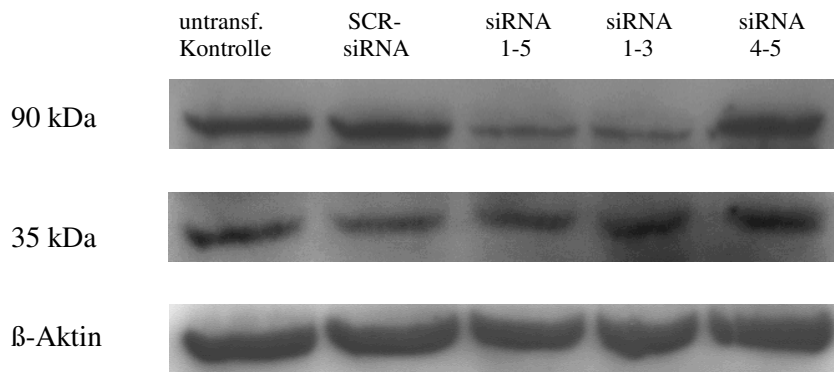


Abb. 4.9 Transfektion von Zellen am Mikroporator mit verschiedenen Sequenzen-Mischungen

Der PIBF- und β-Aktin-Nachweis erfolgte mittels Western Blot. β-Aktin diente als Auftragskontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse für die Transfektion am Mikroporator 48h nach Transfektion.

(SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

Da die Transfektion am Mikroporator und mit der Mischung der 5 Sequenzen die besten Transfektionsraten erzielte, wurden die weiteren Transfektionen mehrmals unter diesen Bedingungen durchgeführt, um einen signifikanten „Knockdown“ von PIBF zu erreichen.

Die Zellen wurden 24, 48 und 72h nach Transfektion geerntet und lysiert und der Erfolg der Transfektionen mithilfe von Elektrophorese und Western Blot bewertet. Für die nukleäre 90 kDa Isoform von PIBF konnte nach 24h eine Expressionshemmung bis auf etwa 25% erreicht werden. 48h nach Transfektion wurde ein signifikanter „Knockdown“ bis auf etwa 36% Expression erzielt. Nach 72h wurde festgestellt, dass die Expression der 90 kDa Isoform erneut zunimmt (siehe Abb. 4.10 und 4.11).

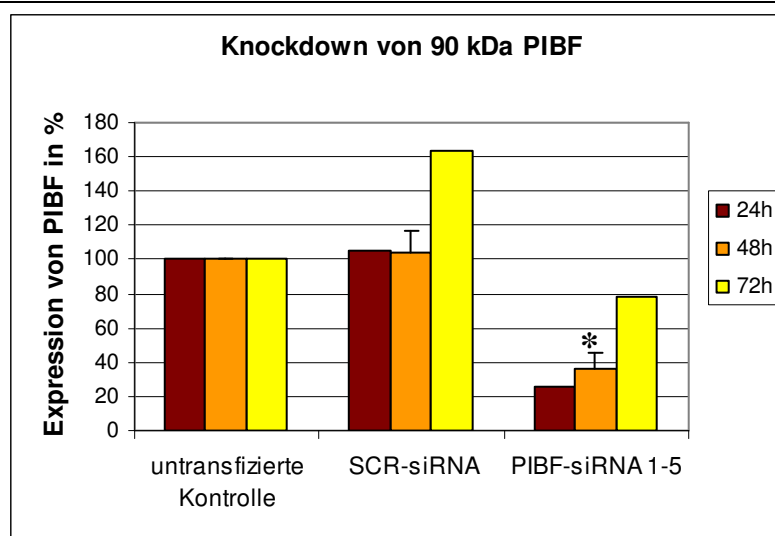


Abb. 4.10 Transfektion von Zellen mit der 5 Sequenzen-Mischung

Die Zellen wurden nach 24h (n=1), 48h (n=3) und 72h (n=1) lysiert und der Transfektionserfolg im Western Blot analysiert. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an. Die Unterschiede zwischen den untransfizierten Kontrollen sowie der mit SCR-siRNA behandelten Zellen im Vergleich mit den PIBF-siRNA transfizierten Zellen sind signifikant (* $p < 0,05$, vs. untransfizierte Kontrolle und SCR-siRNA, Student's t-Test). (SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

90 kDa PIBF 24, 48 und 72h nach Transfektion

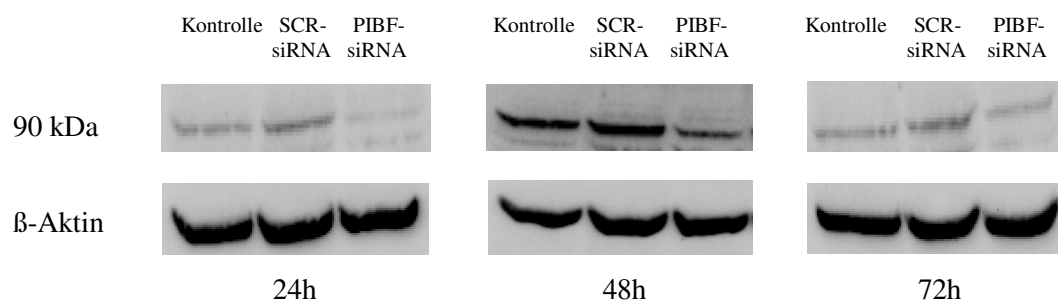


Abb. 4.11 Transfektion von Zellen mit der 5 Sequenzen-Mischung

Der PIBF- und β-Aktin-Nachweis erfolgte mittels Western Blot. β-Aktin diene als Auftragskontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse für die Transfektion am Mikroporator 24h (n=1), 48h (n=3) und 72h (n=1) nach Transfektion. (SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

Die Expression der 35 kDa Isoform von PIBF, die sich im Zytoplasma befindet und in der Schwangerschaft die aktive Form von PIBF darstellt, konnte 48h nach Transfektion signifikant um ca. 20% reduziert werden. Nach 72h Transfektion konnte eine stärkere Expressionshemmung bis auf etwa 52% beobachtet werden (siehe Abb. 4.12 und 4.13).

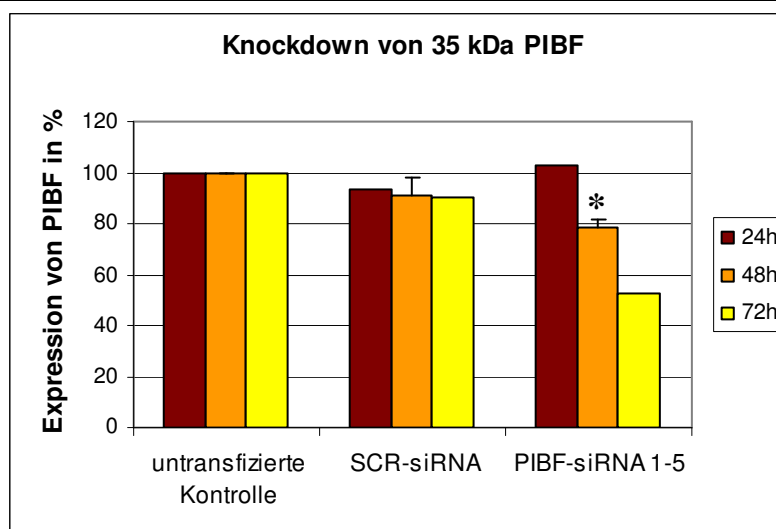
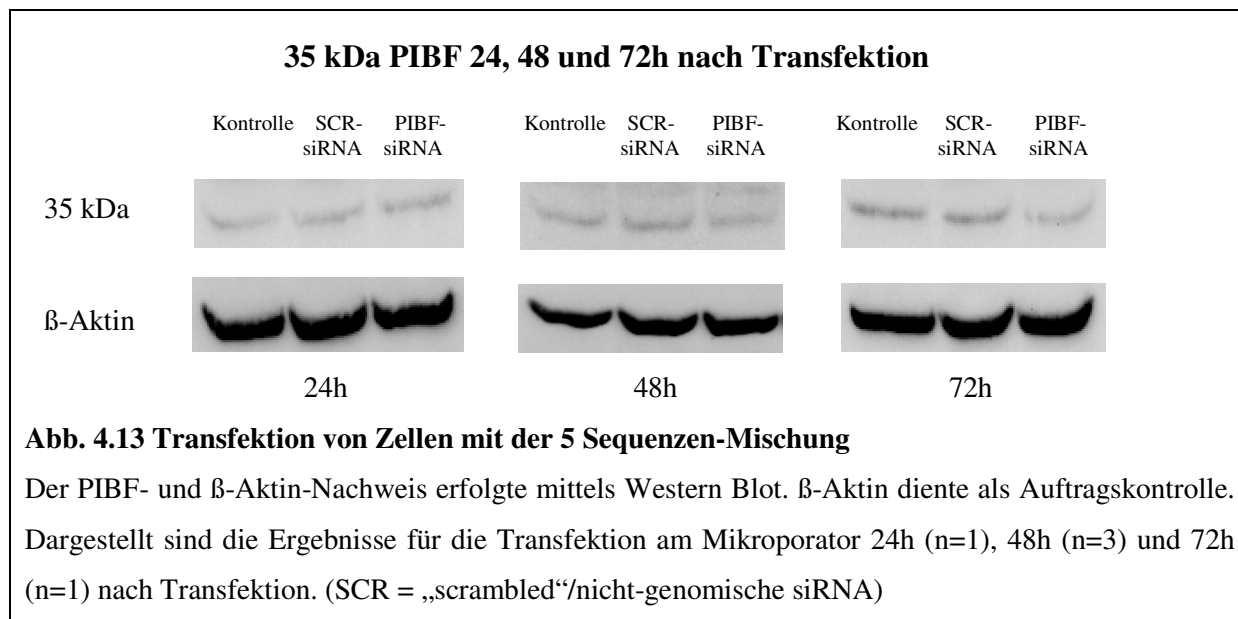
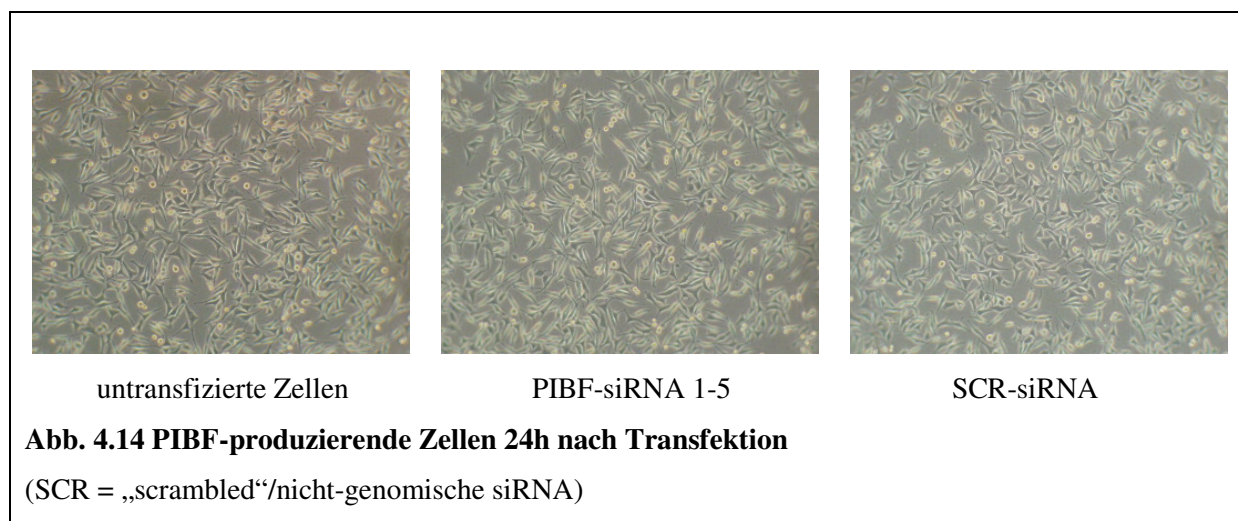


Abb. 4.12 Transfektion von Zellen mit der 5 Sequenzen-Mischung

Die Zellen wurden nach 24h (n=1), 48h (n=3) und 72h (n=1) lysiert und der Transfektionserfolg im Western Blot analysiert. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an. Die Unterschiede zwischen den untransfizierten Kontrollen im Vergleich mit den PIBF-siRNA transfizierten Zellen sind signifikant (*p < 0,05, vs. untransfizierte Kontrolle, Student's t-Test). (SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)



Die Abb. 4.14 macht deutlich, dass die Behandlung mit SCR-sowie mit PIBF-siRNA keinen negativen Effekt auf die Vitalität der PIBF-produzierenden Zellen hat.

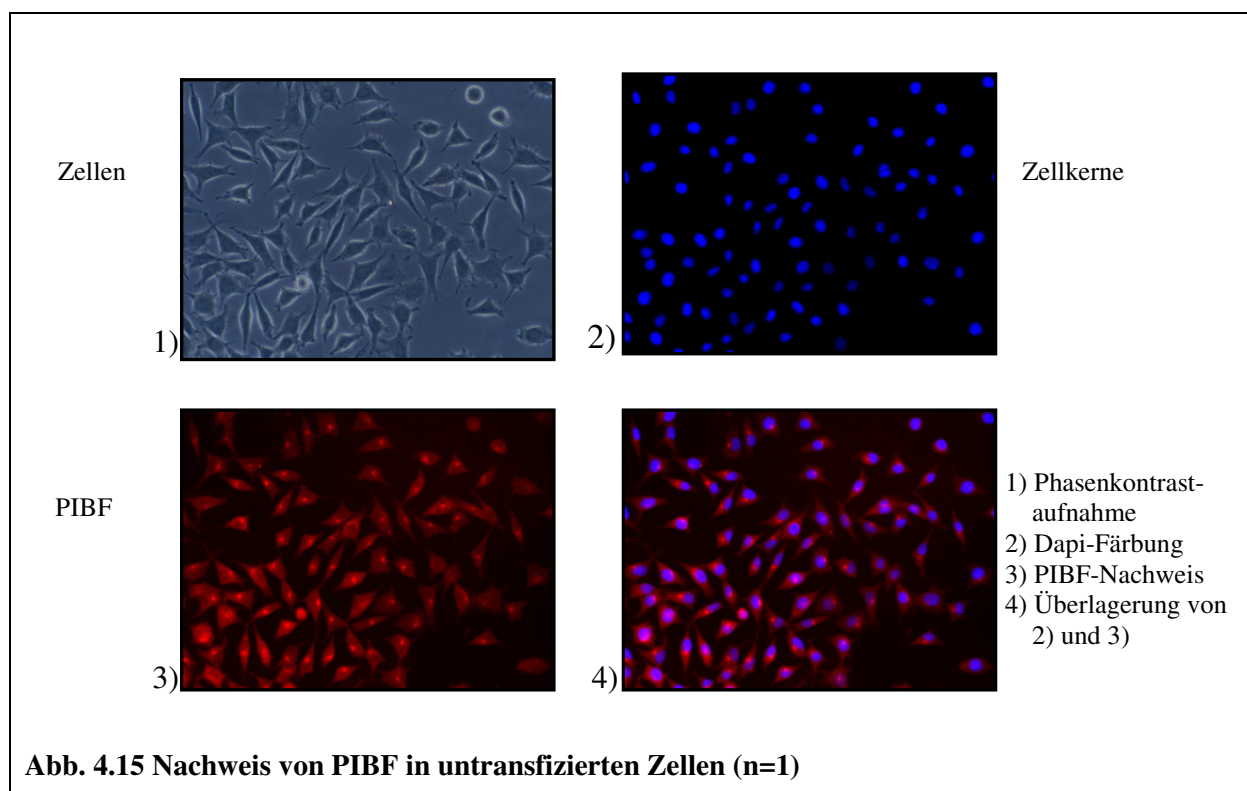


Für anschließende funktionelle Versuche wurden die Transfektionen mittels Mikroporation und der 5 Sequenzen-Mischung durchgeführt und die Zellen 48h nach Transfektion für weitere Versuche geerntet.

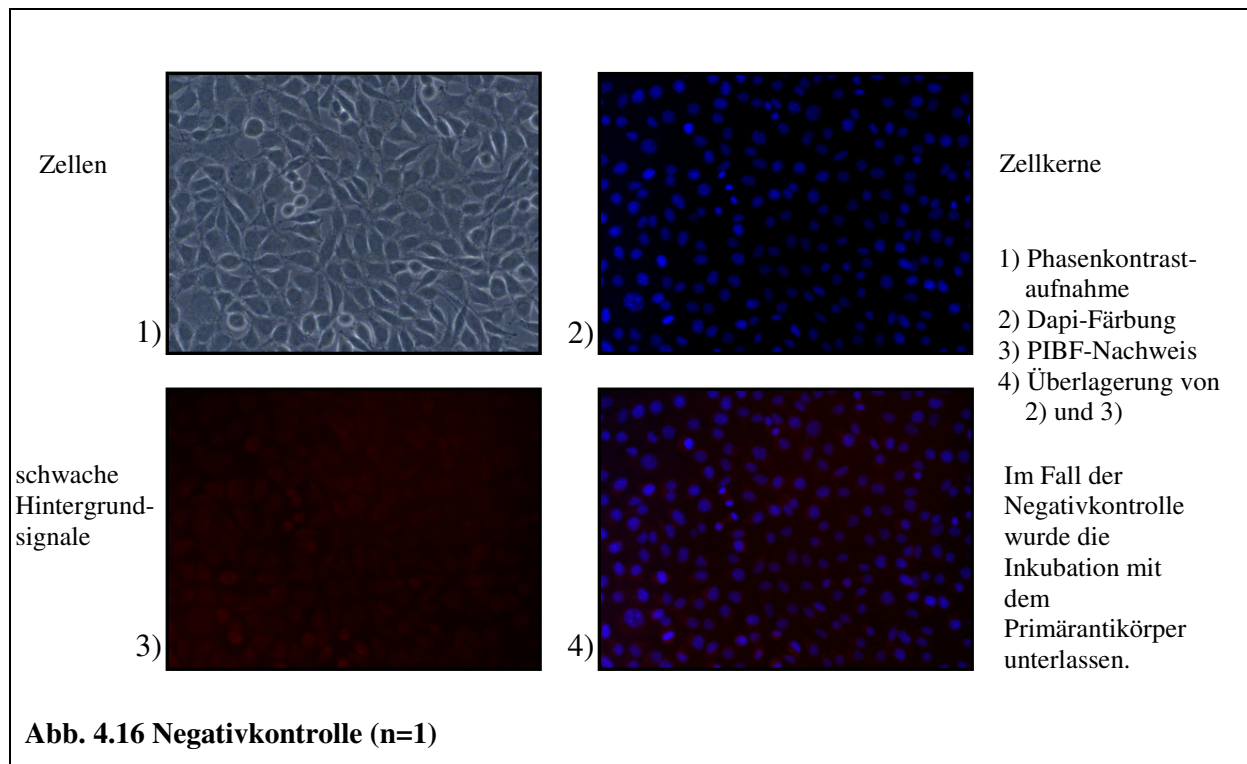
4.2 Nachweis des PIBF – „Knockdowns“ mittels Immunzytochemie

Mit der Immunzytochemie (Abb. 4.15 bis 4.18) stand eine weitere Methode zur Verfügung, den erfolgreichen „Knockdown“ der PIBF Expression zu demonstrieren. Die Zellen wurden 48h nach der Transfektion mit Paraformaldehyd fixiert und die Immunzytochemie wurde gemäß Protokoll (siehe Methoden 3.7) durchgeführt. Das Ergebnis wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Parallel wurden untransfizierte Zellen als Negativkontrolle mitgeführt. Diese wurden nicht mit dem ersten Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen des zweiten Antikörpers auszuschließen.

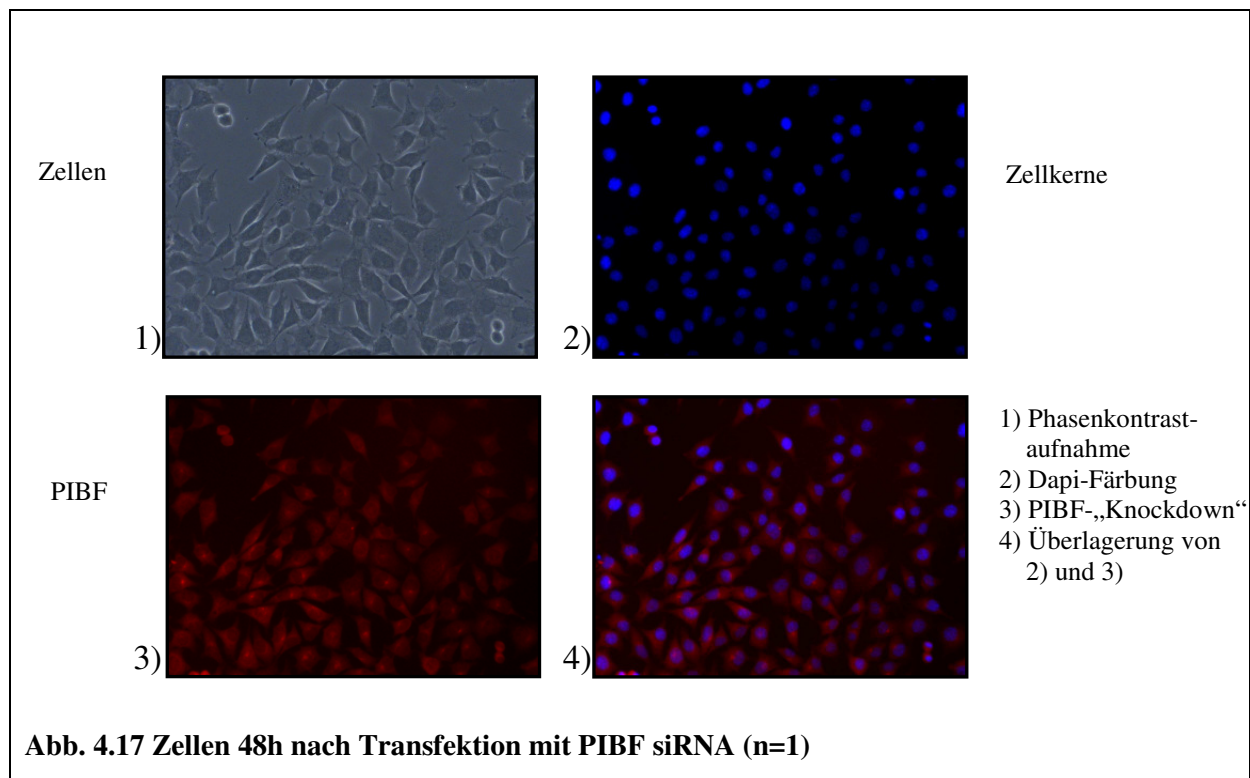
Die untransfizierten Zellen, welche als Positivkontrolle dienten, zeigen eine Expression von PIBF (Abb. 4.15). Hierbei ist auffallend, dass die kernassoziierte 90 kDa Isoform von PIBF als stark rot leuchtender Spot perinukleär imponiert, während die 35 kDa Isoform, welche im Zytoplasma lokalisiert ist, eine diffuse Färbung des Zytoplasma verursacht.



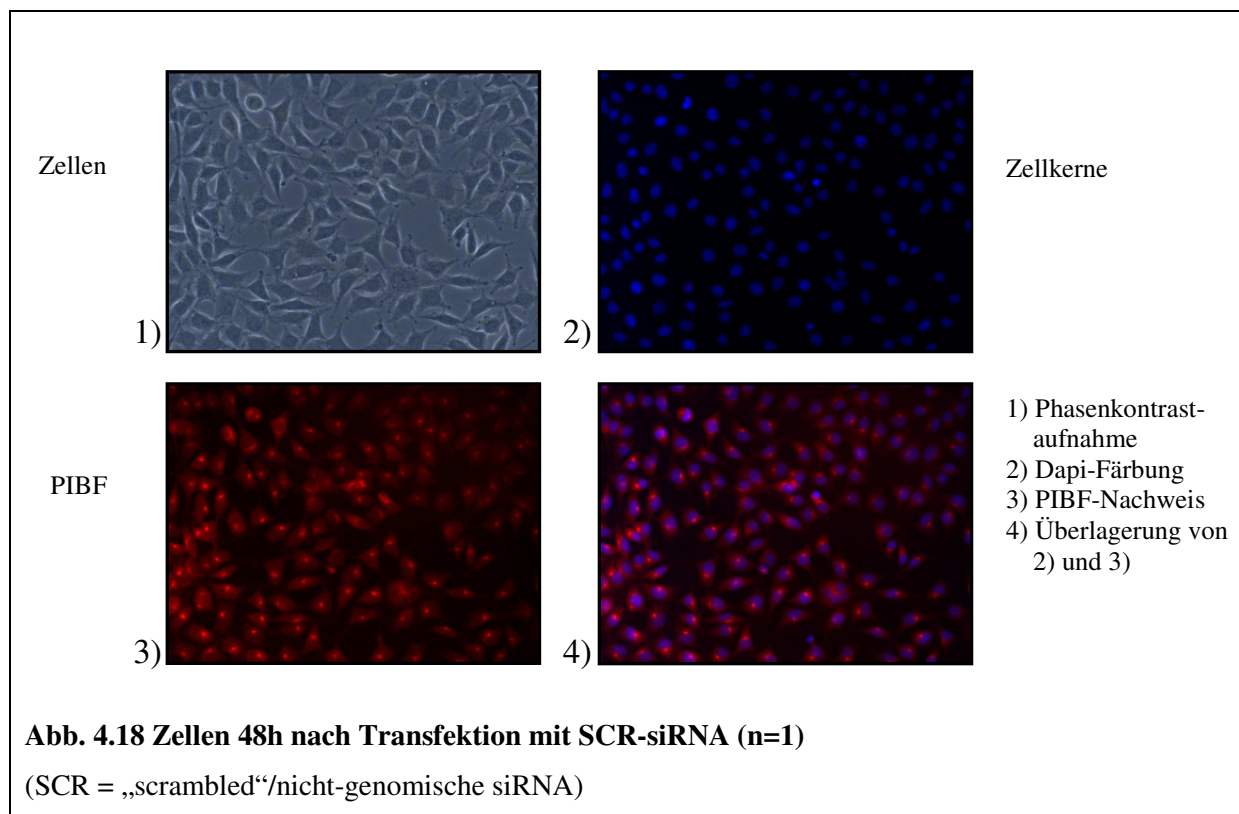
Die Negativkontrolle dagegen zeigt nur schwache Hintergrundsignale (Abb. 4.16).



Nach der Transfektion mittels Mikroporation und Verwendung der 5 siRNA-Sequenzen zusammen, konnte ein erfolgreicher „Knockdown“ mithilfe der Immunzytochemie gezeigt werden. Auffallend ist die Reduktion der stark leuchtenden Spots in Kernnähe, die mit der 90 kDa Isoform von PIBF korrelieren. Die diffuse Färbung des Zytoplasmas ist nach Transfektion ebenfalls reduziert (Abb. 4.17).

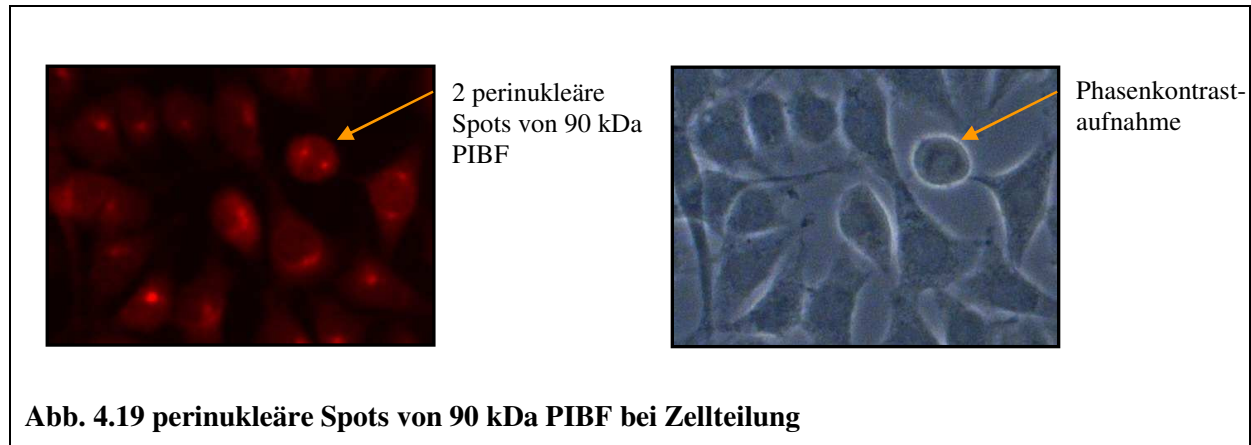


Zusätzlich wurden Zellen mit einer Kontroll-siRNA transfiziert. Hier zeigt sich, dass diese SCR-siRNA keinen Effekt auf die Expression von PIBF in den Zellen hat (Abb. 4.18).



Zentrosomale Lokalisation von 90 kDa PIBF

Die 90 kDa Isoform von PIBF zeigt in der Immunzytochemie einen stark leuchtenden perinukleären Spot. Bei PIBF-produzierenden Zellen, die sich in Teilung befinden, sind 2 sich gegenüberliegende Spots zu beobachten (Abb. 4.19).



4.3 Die Funktion von PIBF in Zellen

Um die Funktion von PIBF in Zellen zu analysieren, wurde die Expression von PIBF mittels siRNA gehemmt und der Effekt der Transfektion wurde anschließend in funktionellen Experimenten objektiviert.

Einfluss von PIBF auf die Proliferation von Zellen

Um den Einfluss von PIBF auf die Proliferation von Zellen zu analysieren, wurde in 2 unabhängigen 24h Assays und 5 unabhängigen 48h Assays das proliferative Verhalten von jeweils 3×10^4 transfizierten und nicht transfizierten Zellen verglichen. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen und Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA (sog. SCR-siRNA) transfiziert wurden.

In den zweimalig durchgeführten 24h Assays schien die Proliferationsrate der mit der PIBF-siRNA 1-5 behandelten Zellen etwas geringer zu sein (Abb. 4.20). Um einen stärkeren Effekt des PIBF „Knockdowns“ zu sehen, wurde die Inkubationszeit auf 48h verlängert.

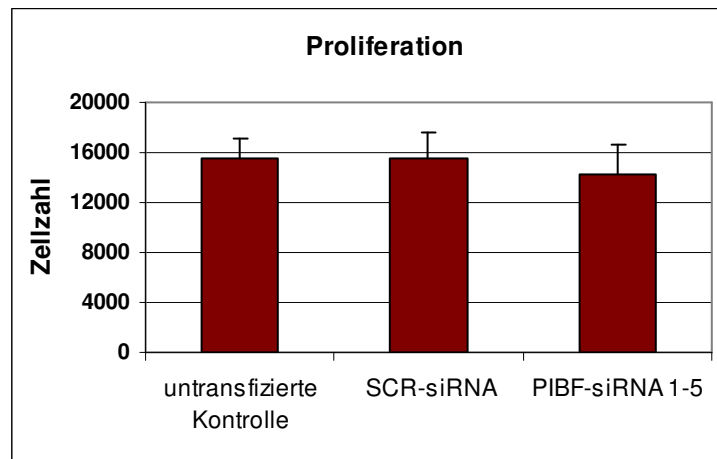


Abb. 4.20 Proliferationsassay über 24h (n=2)

In 2 unabhängigen 24h Assays wurde das proliferative Verhalten von jeweils 3×10^4 transfizierten und untransfizierten Zellen verglichen. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an.

(SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

Der 5 malig durchgeführte Proliferationsassay über 48h zeigte eine signifikant geringere Proliferation der mit PIBF-siRNA behandelten Zellen. Der Student's t-Test ergab für die 5 unabhängigen 48h Assays eine Signifikanz zwischen der untransfizierten Kontrolle und den PIBF-siRNA transfizierten Zellen. Die Proliferation PIBF-siRNA transfizierter Zellen war im Vergleich mit untransfizierten Zellen etwa 32% geringer. Die Behandlung mit Kontroll-siRNA (SCR-siRNA) scheint die Zellen in ihrem proliferativen Verhalten nicht wesentlich zu beeinflussen (Abb. 4.21).

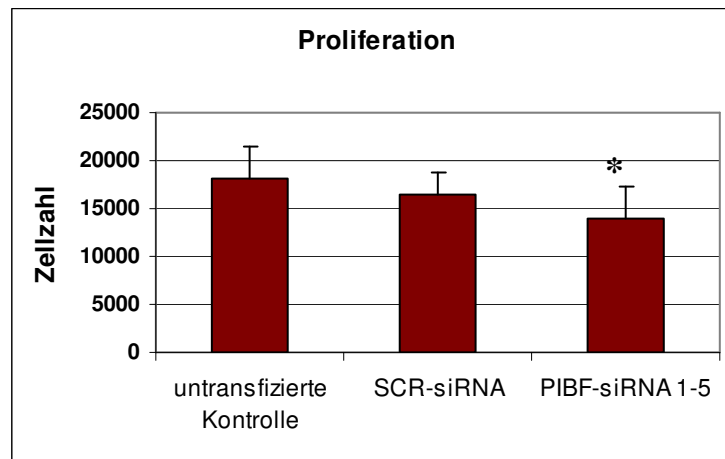


Abb. 4.21 Proliferationsassay über 48h (n=5)

In 5 unabhängigen 48h Assays wurde das proliferative Verhalten von jeweils 3×10^4 transfizierten und untransfizierten Zellen verglichen. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an. Die Unterschiede in der Proliferation der untransfizierten Kontrolle und der PIBF-siRNA transfizierten Zellen sind signifikant. (* $p < 0,05$, vs. untransfizierte Kontrolle; Student's t-Test). (SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

Einfluss von PIBF auf die Migration von Zellen

Das Migrationsverhalten von jeweils 3×10^4 transfizierten und nicht transfizierten Zellen wurde in 2 unabhängigen 24h Assays und in 5 unabhängigen 48h Assays analysiert. Der „Knockdown“ von PIBF scheint keinen Effekt auf das Migrationsverhalten von Zellen zu haben. Auch scheint die Kontroll-siRNA keinen Einfluss auf die Migration zu haben. In den beiden 24h Assays ergab sich eine gering höhere Migration der PIBF-siRNA transfizierten Zellen im Vergleich mit untransfizierten Zellen um etwa 18% (Abb. 4.22). Dies ist aber nur als Trend zu werten.

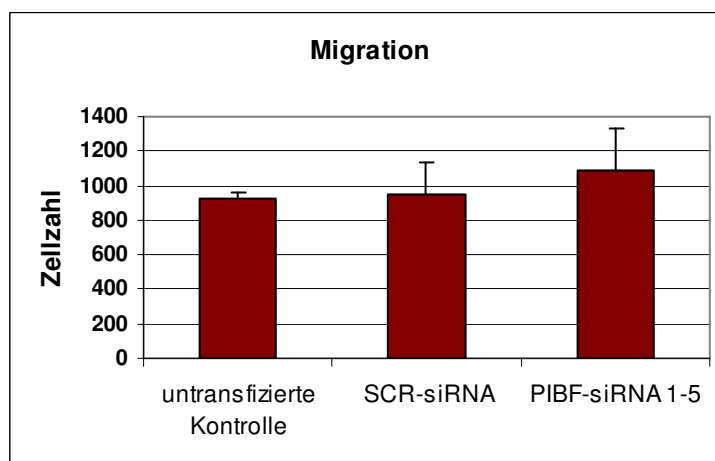


Abb. 4.22 Migrationssassay über 24h (n=2)

In 2 unabhängigen 24h Assays wurde das Migrationsverhalten von jeweils 3×10^4 transfizierten und untransfizierten Zellen verglichen. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an.

(SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

Auch hier wurde die Inkubationszeit auf 48h verlängert, um ein aussagekräftigeres Ergebnis zu erzielen. Die 5 malig durchgeführten Migrationsassays zeigten keine großen Unterschiede im Migrationsverhalten der Zellen. Der Student's t-Test ergab für die 5 unabhängigen 48h Assays keine signifikanten Unterschiede im Migrationsverhalten von transfizierten und untransfizierten Zellen (Abb. 4.23).

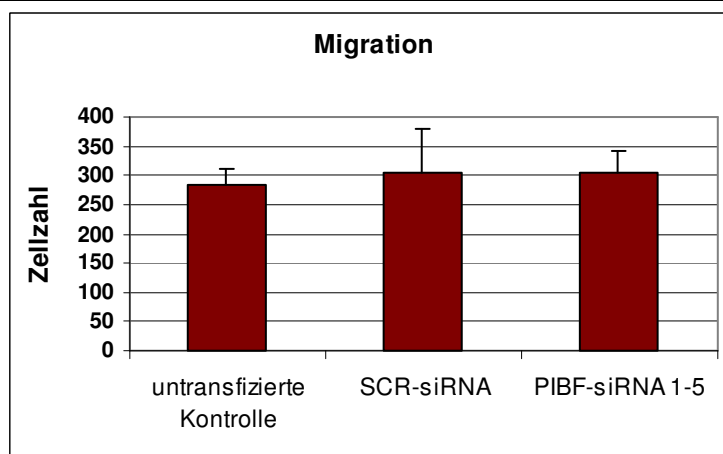


Abb. 4.23 Migrationssassay über 48h (n=5)

In 5 unabhängigen 48h Assays wurde das Migrationsverhalten von jeweils 3×10^4 transfizierten und untransfizierten Zellen verglichen. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an. Es gibt keine signifikanten Unterschiede im Migrationsverhalten von transfizierten und untransfizierten Zellen.

(SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

Einfluss von PIBF auf die Invasion von Zellen

Um den Einfluss von PIBF auf die Invasion von Zellen zu analysieren, wurde in 2 unabhängigen 24h Assays und 5 unabhängigen 48h Assays das invasive Verhalten von jeweils 3×10^4 transfizierten und nicht transfizierten Zellen verglichen. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen und Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA (sog. Scrambled-siRNA) transfiziert wurden.

In den 24h Assays als auch in den 48h Assays zeigte sich ein invasiveres Verhalten der PIBF-siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zu den untransfizierten und Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Der 24h Assay zeigte eine Zunahme der Invasion der PIBF-siRNA transfizierten Zellen um etwa 44% im Vergleich der untransfizierten Zellen (Abb. 4.24). Dies ist aber nur als Trend zu werten.

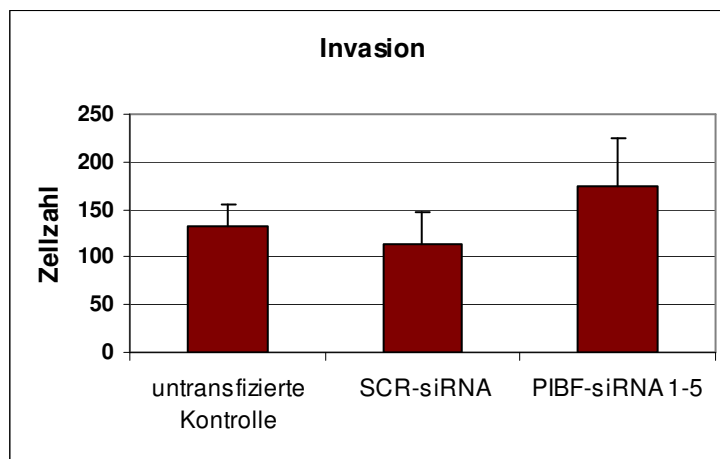


Abb. 4.24 Invasionsassay über 24h (n=2)

In 2 unabhängigen 24h Assays wurde das Invasionsverhalten von jeweils 3×10^4 transfizierten und untransfizierten Zellen verglichen. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an.

(SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

Für die 5 unabhängigen 48h Assays ergab der Student's t-Test eine Signifikanz zwischen den mit SCR-siRNA behandelten Zellen im Vergleich mit den PIBF-siRNA transfizierten Zellen. Hier zeigte sich ein um etwa 27% erhöhtes Invasionsverhalten der PIBF-siRNA transfizierten im Vergleich mit untransfizierten Zellen (Abb. 4.25).

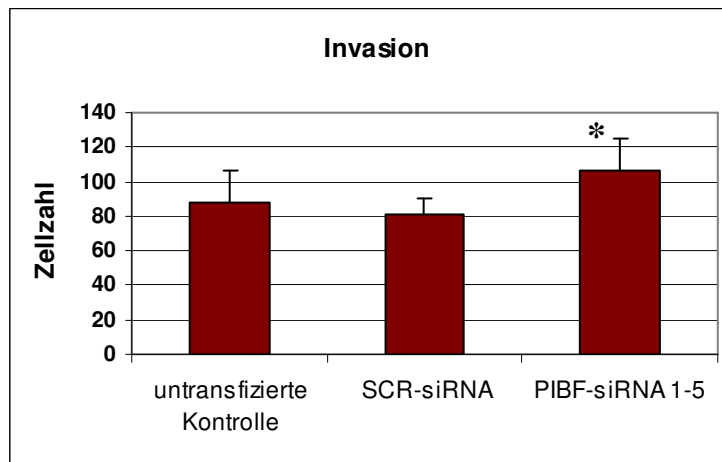


Abb. 4.25 Invasionssassay über 48h (n=5)

In 5 unabhängigen 48h Assays wurde das Invasionsverhalten von jeweils 3×10^4 transfizierten und untransfizierten Zellen verglichen. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler an. Die Unterschiede in der Invasion der SCR-siRNA transfizierten Zellen und der PIBF-siRNA transfizierten Zellen sind signifikant. (* $p < 0,05$, vs. SCR-siRNA, Student's t-Test). (SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

Einfluss von PIBF auf Zytotoxizität

Um einen eventuellen Einfluss des PIBF „Knockdown“ auf die Zytotoxizität von peripheren Spenderlymphozyten gegenüber PIBF-produzierenden Zellen zu untersuchen, wurden mehrere Zytotoxizitätsassays mit verschiedenen Effektor/Target-Verhältnissen sowie verschiedenen Inkubationszeiten getestet.

Etablierung des Zytotoxizitätstests für PIBF-produzierende Zellen und Lymphozyten

Der Zytotoxizitätstest wurde durchgeführt, um den Einfluss von PIBF auf die Zytotoxizität von Lymphozyten zu untersuchen. Hierzu wurde der Test zur Etablierung mit verschiedenen Effektor/Target-Verhältnissen (5:1, 10:1 und 25:1) sowie verschiedenen Inkubationszeiten (24 und 48h) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer.

Die Ergebnisse in Abb. 4.26 zeigen, dass die Zytotoxizität bei allen Effektor/Target-Verhältnissen gering ist. Auch die unterschiedlichen Inkubationszeiten zeigten keinen starken Effekt.

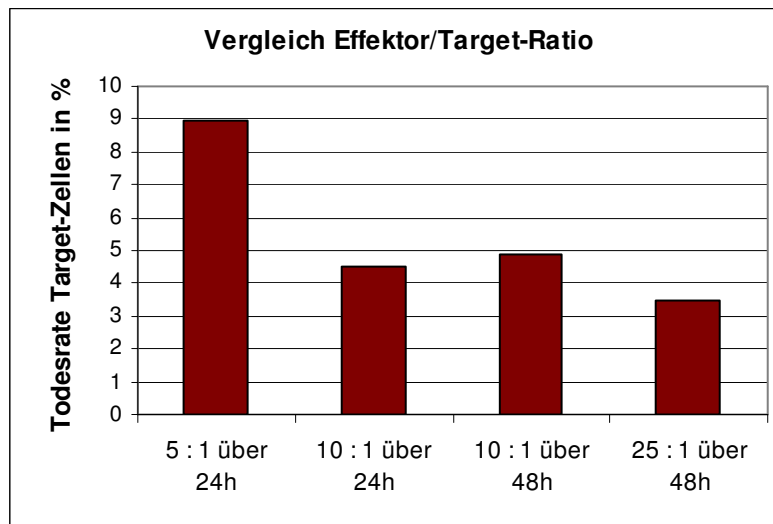
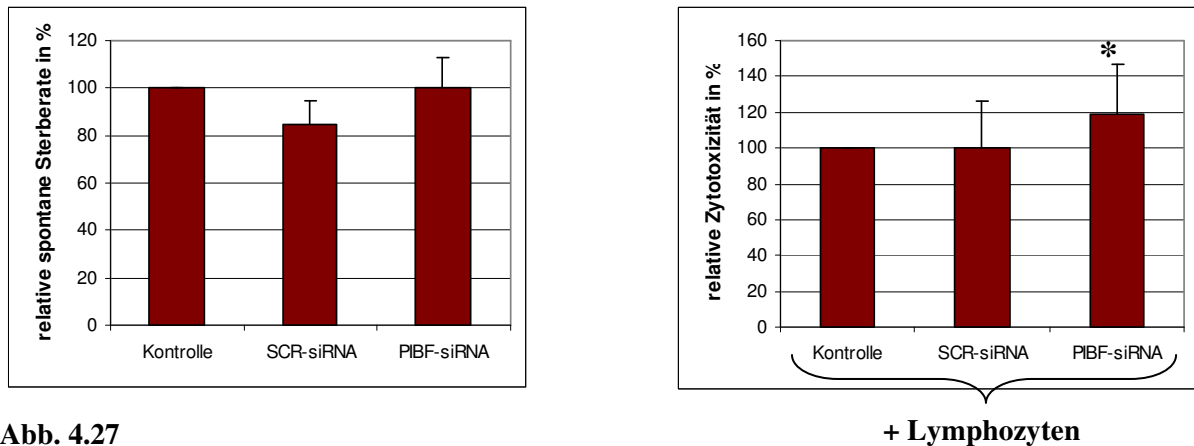


Abb. 4.26 Vergleich Effektor/Target-Verhältnis

Zytotoxizität von Lymphozyten gegenüber PIBF-produzierenden Zellen. Vergleich verschiedener Effektor/Target-Verhältnisse und Inkubationszeiten.

Die sich anschließenden Zytotoxizitätstests wurden mit einem Effektor/Target-Verhältnis von 10:1 über 48h in 4 unabhängigen Experimenten durchgeführt. Hierbei zeigte sich nach dem „Knockdown“ von PIBF ein Trend zu einer stärkeren Zytotoxizität der Lymphozyten gegenüber den Zellen. Der Unterschied von SCR-siRNA behandelten Zellen und PIBF-siRNA behandelten Zellen war laut Student's t-Test signifikant. Der Vergleich der spontanen Todesrate von Zellen zeigt, dass die Transfektion mit SCR- sowie PIBF-siRNA, ohne Anwesenheit von Lymphozyten, keinen negativen Effekt auf das Überleben der Zellen hat (Abb. 4.27).

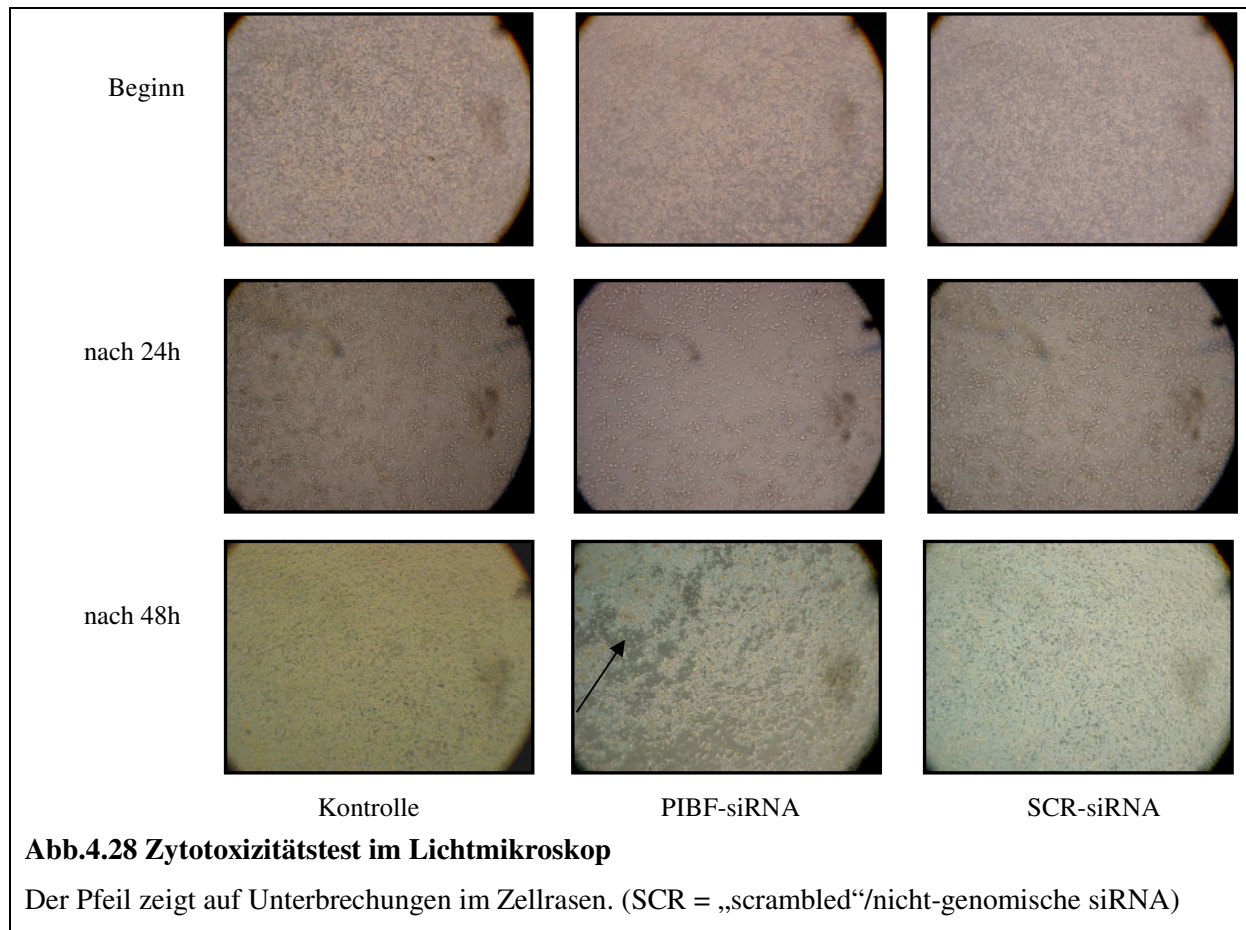
**Abb. 4.27**

Links: Relative spontane Sterberate der PIBF-produzierenden Zellen. Kontrolle = 100%

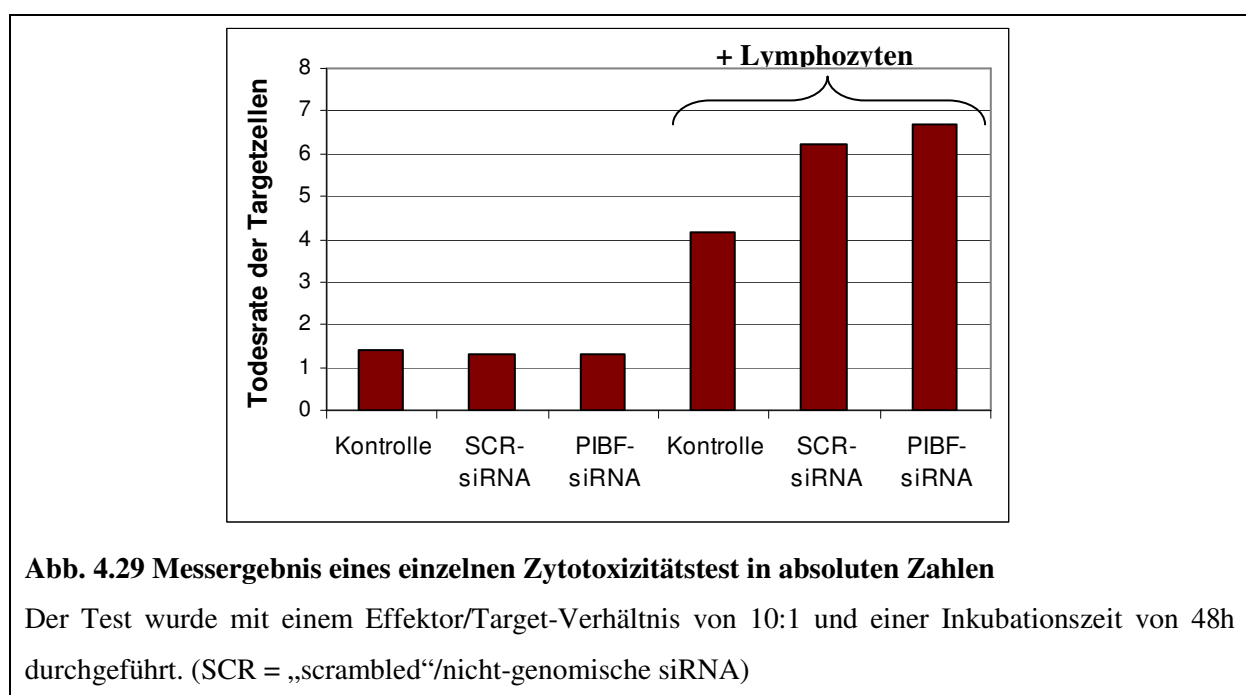
Rechts: Relative Zytotoxizität der Lymphozyten gegenüber der Target-Zelllinie nach dem „Knockdown“ von PIBF mit einem Effektor/Target-Verhältnis von 10:1 und einer Inkubationszeit von 48h. Kontrolle wurde = 100% gesetzt. Dargestellt sind die Standardfehler von 4 unabhängigen Experimenten. Die Unterschiede in der Zytotoxizität der SCR-siRNA transfizierten Zellen und der PIBF-siRNA transfizierten Zellen sind signifikant (* $p < 0,05$, vs. SCR-siRNA, Student's t-Test).

(SCR = „scrambled“/nicht-genomische siRNA)

Die Aufnahmen (Abb. 4.28) mit dem Lichtmikroskop zu Beginn des Zytotoxizitätstest sowie nach 24 und 48 h Inkubationszeit verdeutlichen beispielhaft die Veränderungen der Zelldichte und ihrer Todesrate. Bei den mit PIBF-siRNA behandelten Zellen lässt sich bereits nach 24h eine etwas geringere Zelldichte im Vergleich zu den Kontrollzellen und denen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, feststellen. Nach 48h sind deutliche Unterbrechungen im Zellrasen zu sehen (siehe Pfeil in Abb. 4.28). Die Todesrate der PIBF-siRNA transfizierten Zellen scheint viel größer als die der Kontroll- und SCR-siRNA-Zellen zu sein.

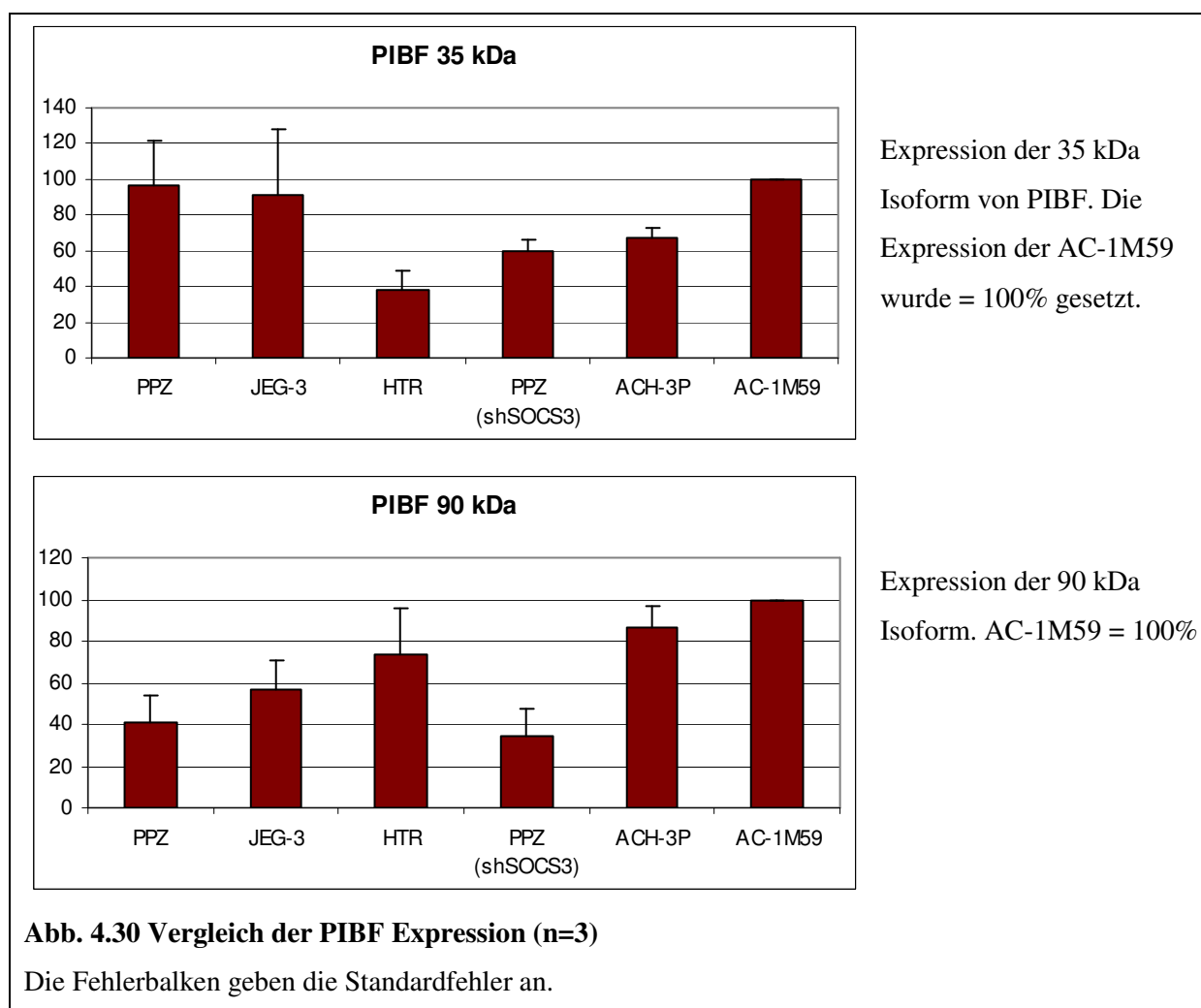


Die Abb. 4.29 zeigt die Messergebnisse eines einzelnen Zytotoxizitätstests. Die Todesrate der Zellen ohne Lymphozyten ist sehr gering. Nach Inkubationszeit der Target-Zellen mit Lymphozyten sterben vermehrt die Zellen, bei denen mittels siRNA-Transfektion die Expression von PIBF ausgeschaltet wurde.



4.4 Vergleich der PIBF Expression verschiedener Zelllinien

Um die Unterschiede in der Expression der 90 und 35 kDa PIBF-Isoformen in onkologischen und nicht-onkologischen Zelllinien zu untersuchen, wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt. Abb. 4.30 verdeutlicht, dass sowohl die 35 kDa Isoform von PIBF als auch die 90kDa Isoform sehr unterschiedlich exprimiert werden. Die stärkste Expression beider Isoformen zeigte sich wiederholt bei den AC-1M59 Zellen. Die PIBF-produzierende Zelllinie (shSOCS3), bei der die Expression von SOCS3 durch eine shRNA (short hairpin RNA) unterdrückt ist, zeigte die geringste Expression der 90kDa PIBF Isoform. Die nicht-kanzerogene Zelllinie HTR8/SVneo zeigt die geringste Expression der 35 kDa Isoform.



5. Diskussion

5.1 Die Funktion und Regulation von PIBF

In dieser Arbeit sollte die Funktion von PIBF in der Chorionkarzinomzelllinie Jar, die ein Modell für Trophoblasten darstellt, untersucht werden. Da sich, wie bereits beschrieben, nach Abschluss der Experimente herausstellte, dass es sich bei den Zellen nicht um Chorionkarzinomzellen handelt, diese dennoch PIBF produzierten, wird in der Diskussion vorrangig die Funktion und Regulation von PIBF in Zellen betrachtet.

Die PIBF mRNA wurde bereits in vielen onkologischen und nicht-onkologischen Zellen, die eine hohe Proliferationsrate aufweisen, gefunden. Hierzu gehört u.a. Plazenta und fetales Gewebe von Mensch und Maus, Testes, Mamma- und Magenkarzinom (Lachmann et al. 2004). Dies deutet darauf hin, dass es sich um ein sehr stabiles Protein handeln könnte, was auf der einen Seite essentiell für die Reproduktion ist und auf der anderen Seite durch seine immunsuppressiven Effekte Tumorwachstum und möglicherweise auch die Metastasierung begünstigen kann.

5.2 Transfektion der Zellen mit siRNA

Um eine erfolgreiche Hemmung der Expression des Proteins PIBF zu erreichen, wurden mehrere Varianten der siRNA Transfektion durchgeführt. Der Mechanismus der RNA Interferenz ist ein evolutionär konservierter Vorgang posttranskriptioneller Gen-„Stummschaltung“, der in einer spezifischen mRNA Degradierung resultiert (Fire et al. 1998 und Hannon 2002). In dieser Arbeit wurden synthetische siRNAs verwendet, die das bereits durch den Dicer geschnittene siRNA-Produkt darstellen. Diese wurden mithilfe mehrerer Methoden versucht in die Zellen einzubringen, um anschließend die Auswirkungen eines „Knockdowns“ zu analysieren.

Etablierung der siRNA Transfektion

Es wurden 2 verschiedene Transfektionsreagenzien (Nanofectin und Oligofectamin) sowie Elektroporation getestet, um eine effektive Expressionshemmung von PIBF zu erreichen. Getestet wurden außerdem 5 verschiedene siRNA Sequenzen, spezifisch für PIBF. Bei allen 3 Transfektionsmethoden konnte mit den 5 siRNAs einzeln kein reproduzierbarer „Knockdown“ erzielt werden. Deswegen wurde versucht durch eine Mischung der 5 verschiedenen siRNAs eine bessere Transfektionsrate herbeizuführen. Hierbei wurde die Konzentration der siRNAs bewusst nicht erhöht, um Effekte wie eine erhöhte Zytotoxizität, unspezifische Bindungen oder eine Stressreaktion der Zellen zu vermeiden. Dieses sog. Pooling von siRNAs ist zum einen sinnvoll, um Off-Target Effekte zu eliminieren, da es unwahrscheinlich ist, dass verschiedene siRNA Sequenzen, die die gleiche Zielsequenz haben, auch die gleichen sequenz-abhängigen Off-Target Effekte aufweisen (Sledz und Williams 2005). Zum anderen ist es nützlich, da laut Sledz und Williams nicht alle siRNAs, die die gleiche Zielsequenz haben, auch die gleiche Effizienz im Gene silencing besitzen (Sledz und Williams 2005).

Transfektion mit liposomalen Transfektionsreagenzien

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, erbrachte die Transfektion der 5 siRNAs einzeln sowie als 5 Sequenzen Mischung mit Oligofectamin keinen reproduzierbaren „Knockdown“ von PIBF. Auch die mit SCR-siRNA transfizierten Zellen zeigten Veränderungen der PIBF Expression. Hierfür könnten unspezifische Effekte verantwortlich sein. Die Transfektion der siRNA-Sequenzen-Mischung mit Nanofectin erbrachte gute Ergebnisse (siehe Kapitel 4.1) für den „Knockdown“ von 90 kDa PIBF, nicht jedoch für die 35 kDa Isoform von PIBF. Doch aufgrund einer erhöhten Sterberate der Zellen wurden die weiteren Experimente nicht mit diesem Transfektionsreagenz durchgeführt. Die erhöhte Sterberate ließe sich mit einer Interferon-induzierten Antwort der Zellen erklären, die die Apoptose der Zellen triggert. Judge et al. konnten zeigen, dass liposomale Transfektionreagenzien die Freisetzung inflammatorischer Zytokine erleichtern können (Judge et al. 2005). Liposomale Transfektionsreagenzien scheinen für die PIBF-produzierenden Zellen nicht geeignet zu sein.

Mikroporation

Mit der Methode der Mikroporation und der 5 Sequenzen-Mischung konnte die beste Expressionshemmung von PIBF erzielt werden. Auch schien diese Behandlung die Zellen in ihrer Sterblichkeit nicht negativ zu beeinflussen. Bei der Mikroporation gelangen die siRNAs

durch Poren direkt in das Zytoplasma der Zelle. Die Vorteile der Mikroporation liegen u.a. in der hohen Transfektionseffizienz und der guten Zellüberlebensrate. Dies wird gewährleistet durch den Aufbau der Elektroporationsspitze. Durch das kapilläre Design der elektrischen Kammer, kann der Elektrodenabstand maximiert und die Oberfläche der Elektroden minimiert werden. Es entsteht ein homogenes elektrisches Feld, in dem die Effekte von Hitze und Metallionen weitestgehend reduziert werden können (www.microporator.com).

Für die weiterführenden Experimente wurden alle Transfektionen mit der 5 Sequenzen-Mischung und der Mikroporation durchgeführt.

Mittels Mikroporation konnte die Expression der 90kDa Isoform von PIBF signifikant um mehr als 70% verringert werden. Dagegen konnte die Expression der 35 kDa PIBF-Isoform maximal um ca. 48% verringert werden.

Limitierung der RNA Interferenz

Ein durch RNA Interferenz vermittelter „Knockdown“ ist von transienter Natur. Er hält in proliferierenden Säugerzellen ca. 3-7 Tage an (Omi et al. 2004). Ursächlich dafür sind u.a. die Proliferationsrate der Zellen sowie die Halbwertszeit des Zielproteins. Laut Sledz und Williams verhalten sich siRNAs relativ stabil unter Zellkulturbedingungen (Sledz und Williams 2005). Um die Effizienz eines „Knockdowns“ mittels RNA Interferenz zu bewerten, muss man mehrere Faktoren mit einbeziehen. Zu diesen Faktoren gehören u.a. die gewählte siRNA - Sequenz und - Struktur sowie die Fähigkeit des Zelltypes zur Aufnahme von siRNA (Siolas et al. 2005 und Kim et al. 2005). Die Menge an verfügbarem RISC kann in verschiedenen Zelltypen sehr variieren und ein zusätzlicher limitierender Faktor im „Gene silencing“ sein (Harborth et al. 2003 und Gonczy et al. 2000).

Alternativen zu siRNAs

Um einen stabileren „Knockdown“ eines Zielproteins zu erreichen, stehen mehrere Alternativen zur Verfügung. Man könnte z.B. chemisch modifizierte siRNAs verwenden. Die chemische Modifizierung von siRNAs erhöht deren Stabilität und deren Aufnahme durch die Zellen (Lee und Sinko 2006). Außerdem können so Off-Target Effekte reduziert werden. Eine weitere Variante stellt die Short-hairpin RNA (shRNA) dar. Mit ihr kann man einen anhaltenden „Knockdown“ erreichen. ShRNAs sind auf Plasmiden oder viralen Vektoren kodierte Sequenzen. Sie werden in das Genom integriert und können so einen andauernden „Knockdown“ des Zielproteins vermitteln (Dorsett und Tuschl 2004). Dennoch darf man

nicht außer Acht lassen, dass solch ein permanenter „Knockdown“ nicht für essentielle Proteine geeignet ist, die überlebenswichtig für eine Zelle sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein effizienter „Knockdown“ eines Zielproteins mittels RNA Interferenz von vielen Faktoren abhängig ist, die man im Voraus beachten und gegebenenfalls optimieren sollte. Dazu gehört u.a. die Transfektionsmethode, die optimale Konzentration an siRNA, optimale Einstellungen am Mikroporator und Vorversuche mit verschiedenen siRNA-Sequenzen für das gleiche Target-Gen, um einen optimalen „Knockdown“ zu erzielen.

„Scrambled“ – siRNA/ nicht-genomische siRNA

Um die Auswirkungen des PIBF-„Knockdowns“ richtig beurteilen zu können, benötigt man Kontrollen. Dazu wurden parallel zu allen RNA-Interferenz Experimenten mehrere Kontrollen mitgeführt. Zum einen waren dies Nativ-Zell-Kontrollen, zum Vergleich mit unbehandelten Zellen und zum anderen sog. „Scrambled“-siRNA Kontrollen. Diese wurden mit einer nicht-genomischen Sequenz transfiziert, um die Spezifität der siRNA-Versuche bewerten zu können. Die Ergebnisse mit SCR-siRNA in dieser Arbeit machen deutlich, dass die Transfektion mit dieser nicht-genomischen siRNA keine oder nur geringe Veränderungen im Expressionsmuster und der Aktivität der Zellen verursacht. Dennoch kann man unspezifische Effekte, die eine Hochregulierung oder Suppression von Nicht-Zielgenen bewirken, nicht gänzlich ausschließen (Sledz und Williams 2004).

Abschließend muss gesagt werden, dass die Ergebnisse des Protein „Knockdowns“ mittels RNA Interferenz auch kritisch betrachtet werden sollten. Das „Gene silencing“ durch siRNAs wird im Allgemeinen als sehr spezifisch beschrieben (Rana 2007). Limitierend für ihre Anwendung sind jedoch unspezifische Effekte von siRNAs. Hierzu gehören zum einen sog. Off-Target Effekte. Dies sind Kreuzreaktionen mit „Nicht-Ziel-Sequenzen“. D.h. zusätzlich zum Zielgen weisen auch andere Gene nach Behandlung mit siRNA Veränderungen in ihrer Expression auf. Zum anderen können siRNAs zelluläre Signalwege aktivieren, die mit der Hochregulierung Interferon-aktivierter Gene assoziiert sind. Laut Dorsett und Tuschl können solche unspezifischen Effekte durch eine geringe Konzentration von siRNA reduziert werden (Dorsett und Tuschl 2004).

5.3 „Knockdown“ von PIBF in Zellen

Mittels Mikroporation und der 5 Sequenzen-Mischung konnte die Expression der 90kDa Isoform von PIBF signifikant um mehr als 70% verringert werden. Dagegen konnte die Expression der 35 kDa PIBF-Isoform maximal um ca. 48% verringert werden.

Bei der 90 kDa Isoform wurde bereits nach 72h eine erneute Zunahme der Expression beobachtet. Dies lässt sich durch eine kurze Halbwertszeit des Proteins erklären. PIBF besitzt eine PEST-Sequenz, die auf eine kurze Halbwertszeit hinweist (Polgar et al. 2003). Die gleiche Gruppe fand heraus, dass neu synthetisiertes 90 kDa PIBF mit dem Nukleus assoziiert ist (Polgar et al. 2003). Dies würde ebenfalls erklären, warum der „Knockdown“ der 90 kDa Isoform bereits nach 72h geringer wird, während der „Knockdown“ der 35 kDa Isoform nach 72h noch anhielt. Die 35 kDa Isoform entsteht bei Aktivierung der Zellen durch Exon Skipping aus dem 90 kDa „full length“ PIBF (Lachmann et al. 2004). Dass der Antikörper beide Isoformen detektiert, spricht dafür, dass beide Isoformen vom gleichen Vorläufer stammen (Porstmann und Arck 2005). Insgesamt erwies es sich als schwieriger eine größere Expressionshemmung der 35 kDa Isoform zu erreichen. Möglicherweise spielt hier der jeweilige Aktivitätszustand der Zellen eine Rolle, so dass die Zellen abhängig davon mehr oder weniger Splice-Varianten vom „full length“ PIBF exprimieren. Dies wurde auch in mehreren Western Blots deutlich, wo die Expressionstärke der 35 kDa Isoform sich sehr unterschiedlich zeigte.

Um bessere funktionelle Untersuchungen durchzuführen, könnte man z.B. durch die Verwendung chemisch modifizierter siRNA oder Short-hairpin RNA einen lang andauernden „Knockdown“ von PIBF erreichen. Dies wäre möglich, da PIBF nicht essentiell für die Aufrechterhaltung normaler Körperfunktionen ist (Check et al. 2009).

Nachweis des „Knockdowns“ mit Immunzytochemie

Mit der Immunzytochemie konnte der erfolgreiche „Knockdown“ ebenfalls demonstriert werden. Wie Lachmann et al. beschrieben, imponiert die 90 kDa Isoform als stark leuchtender perinukleärer Spot, während die 35 kDa Isoform eine diffuse Färbung des Zytoplasma verursacht (Lachmann et al. 2004). Nach PIBF „Knockdown“ verschwand der perinukleäre Spot und die diffuse Färbung des Zytoplasmas wurde geringer.

In sich teilenden Zellen wurden 2 Spots von PIBF beobachtet, was die Vermutung bestätigt, dass das 90 kDa PIBF mit dem Zentrosom assoziiert ist. Es wurden bereits Abnormalitäten des Zentrosoms in Krebszellen beobachtet, doch ihre Rolle in der Tumorgenese ist bisher

noch unklar (Salisbury et al. 1999). Bekannt ist, dass eine gestörte Duplikation des Zentrosoms eine ungleiche Segregation von Chromosomen und eine Tumorgenese verursacht (Lachmann et al. 2004). Die Überexpression Zentrosom-assoziiierter Gene wie PIBF in Tumoren korreliert mit der Amplifikation des Zentrosoms und Aneuploidie (Fisk et al. 2002). Lachmann et al. beobachteten in verschiedenen Zelllinien, dass eine Überexpression des „full-length“ PIBF zu anormalen Kernmorphologien und schließlich zum Zelltod führen (Lachmann et al. 2004). Womöglich könnte eine Funktionsverlustmutation oder Deletion des PIBF-Gens die Wahrscheinlichkeit einer Tumorbildung erhöhen. Tumoren könnten aber auch durch die Fähigkeit selbst PIBF zu produzieren, dessen immunsuppressive Eigenschaften ausnutzen, um vom Immunsystem ungestört proliferieren und metastasieren zu können.

5.4 Funktionelle Analysen von PIBF

Die Proliferation ist nach dem „Knockdown“ von PIBF geringer

Die PIBF cDNA kommt charakteristischer Weise in undifferenzierten, proliferierenden Zellen vor (Polgar et al. 2003). Somit könnte PIBF bei der Proliferation von Zellen eine Bedeutung haben. Die mehrmals durchgeführten Proliferationsassays zeigten eine verminderte Proliferation der Zellen nach PIBF-siRNA Transfektion. Check et al. konnten zeigen, dass Patienten mit weit fortgeschrittenem Kolonkarzinom nach Behandlung mit Mifepriston eine Hemmung der Tumorprogression zeigten (Check et al. 2008). Durch die Gabe von Progesteronantagonisten könnte so möglicherweise eine Produktion von PIBF im Tumor verhindert worden sein und somit auch sein stark proliferierendes Wachstum.

Lachmann et al. konnten zeigen, dass PIBF in Tumorgewebe im Gegensatz zu normalem Gewebe überexprimiert wird und dies zudem unabhängig vom Vorhandensein von Progesteronrezeptoren (Lachmann et al. 2004). Dies bedeutet, dass der Tumor womöglich selbst in der Lage ist PIBF zu produzieren und dessen Eigenschaften ausnutzt, um ungestört vom Immunsystem wachsen und metastasieren zu können.

In der Schwangerschaft führt eine ungenügende Trophoblastproliferation zu einer zu kleinen Plazenta mit einer zu geringen Oberfläche für die Ernährung des Fetus (Soundararajan und Rao 2004). Ursache hierfür könnte ein Mangel an PIBF sein, denn die Ergebnisse der Proliferationsassays zeigen, dass die Proliferationsfähigkeit der Zellen nach PIBF „Knockdown“ niedriger ist.

Kozma et al. konnten zeigen, dass PIBF STAT6 aktiviert (Kozma et al. 2006). STAT6 ist an der Entwicklung invadierender Zellen beteiligt und reguliert außerdem deren Proliferation. Durch einen PIBF „Knockdown“ wird STAT6 nicht aktiviert und dies könnte sich negativ auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen ausgewirkt haben und würde die verringerte Proliferation der Zellen nach „Knockdown“ erklären. Andererseits könnte auch SOCS3 über einen Feedback-Mechanismus durch STAT3 aktiviert worden sein und durch die Negativregulierung von STAT3 die Proliferation hemmen.

Migration

Zellmigration bedeutet die Wanderung von Zellen von einem Gebiet in ein anderes. Dies geschieht als Antwort auf chemische Signale und passiert z. B. bei der Wundheilung, der Zelldifferenzierung, der embryonalen Entwicklung und auch bei der Metastasierung von Tumoren. Um den Einfluss von PIBF auf die Migration von Zellen zu testen, wurden mehrmals unabhängige Migrationsassays durchgeführt. Diese zeigten jedoch keinen signifikanten Effekt der PIBF siRNA Transfektion auf das Migrationsverhalten der Zellen. Die Ergebnisse scheinen im Widerspruch dazu zu stehen, dass nach PIBF „Knockdown“ die Invasivität der Zellen steigt, die eine Migration beinhaltet, aber es ist möglich, dass der hierfür notwendige Stimulus im Matrigel enthalten ist.

Die Invasion ist nach dem „Knockdown“ von PIBF höher

Zellinvasion ist der Migration ähnlich, nur dass hier die Zellen zuerst eine extrazelluläre Matrix enzymatisch degradieren müssen, um an einen neuen Ort zu gelangen. Normale Zellen invadieren als Antwort auf Inflammation, während maligne Zellen durch ihr Invasionsvermögen unkontrolliert metastasieren können. Um herauszufinden, ob ein „Knockdown“ von PIBF das Invasionsverhalten der Zellen verändert, wurden mehrere Invasionsassays durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die Zellen nach dem Ausschalten des Proteins ein invasiveres Verhalten hatten als zuvor. Das würde bedeuten, dass PIBF evtl. einen inhibierenden Einfluss auf die Invasivität besitzt. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass PIBF während der Trophoblastinvasion nicht präsent ist, sondern erst später nachzuweisen ist (Check et al. 2000). Denn während der Peri-Implantationsphase scheint ein lokales proinflammatorisches Milieu für eine optimale Invasion notwendig zu sein (Joachim et al. 2003). PIBF aber würde dem entgegenwirken durch die Beeinflussung der Th1/Th2-Balance in Richtung einer Dominanz von anti-inflammatorischen Th2-Zytokinen (z.B. IL-4, IL-10 und TGF- β). Check et al. konnten PIBF in Lymphozyten nach der Implantationsphase

nachweisen und vermuteten, dass der Stimulus für die Induktion von PIBF kurze Zeit nach der Implantation auftritt (Check et al. 1996). Es ist möglich, dass PIBF nach der Implantation nachzuweisen ist und dann einen inhibierenden Effekt auf die Invasion hat, um eine zu starke Invasion zu verhindern. Eine exzessive Invasion von Trophoblastzellen kann zu einer gestörten Plazentalösung nach der Geburt führen. Bei der Placenta accreta fehlt die Dezidua vollständig, die Trophoblasten sind bis zum Myometrium vorgedrungen. Bei der Placenta increta sind die Trophoblasten bis in das Myometrium gewachsen und bei der Placenta percreta bis in die Serosa hinein (Soundararajan und Rao 2004). Wenn PIBF während der Schwangerschaft die Invasion kontrolliert, könnte ein Fehlen von PIBF während der Schwangerschaft zu solchen Ereignissen beitragen und die Ergebnisse der Invasionsassays unterstützen, die nach PIBF „Knockdown“ eine verstärkte Invasion der Zellen zeigen. Eine zu geringe Invasion hingegen führt zu intra-uteriner Wachstumsretardierung und Präeklampsie (Hiden et al. 2007). Diese Tatsache unterstützt die Ergebnisse der Invasionsassays, denn wäre PIBF bereits zu Beginn der Implantation vorhanden, könnte es diese hemmen und zu oben genannten Störungen beitragen. TGF- β , ein Th2-Zytokin, wirkt hemmend auf die Trophoblastinvasion (Lala und Graham et al. 1990). Es steuert die Differenzierung der invasiven Trophoblastzellen in Synzytiotrophoblasten ohne invasiven Charakter (Graham und Lala 1991). Möglicherweise ist nach dem „Knockdown“ von PIBF weniger TGF- β vorhanden, somit fällt die Kontrolle der Invasion weg und die Zellen können verstärkt invadieren.

Anderle et al. dagegen konnten zeigen, dass PIBF in Arealen der Trophoblastinvasion präsent ist (Anderle et al. 2007). Somit könnte es bei der Trophoblastinvasion eine Rolle spielen. Durch seine immunoregulatorischen Eigenschaften könnte PIBF dazu beitragen, die Implantation zu ermöglichen. Sobald die Trophoblastinvasion beginnt, könnte PIBF durch Modulation des Zytokinprofils und der NK-Aktivität positiv zur Implantation beitragen. PIBF begünstigt eine Th2-Dominanz. Th2-Zytokine stimulieren das Trophoblastenwachstum sowie die Trophoblastinvasion (Chaouat et al. 1995). Andererseits ist PIBF auch noch am Ende der Schwangerschaft in den Trophoblastzellen präsent, wenn diese gar nicht mehr invasiv sind (Trundley and Moffett 2004). Doch möglicherweise ändert sich der Einfluss von PIBF auf die Zellen, weil sich im Laufe der Schwangerschaft die Expression der Isoformen ändert. So fanden Anderle et al. heraus, dass Erst-Trimester-Trophoblasten mehr Isoformen von PIBF exprimieren als Trophoblasten am Ende einer Schwangerschaft (Anderle et al. 2007).

Kozma et al. konnten zeigen, dass PIBF SOCS3 aktiviert (Kozma et al. 2006). SOCS3 ist ein Negativregulator von STAT3, welches in vielen invasiven Tumoren wie Gehirntumoren,

Hautkrebs, Mamma- und Prostatakarzinomen vorkommt und deren Proliferation und Invasivität erhöht (Poehlmann et al. 2005). STAT3 spielt weiterhin eine Rolle bei der Transkription von Th1-Interleukinen in T-Lymphozyten sowie bei der Perforintranskription in NK-Zellen (Corvinus et al. 2003). Die Balance von STAT3 und SOCS3 ist eine der wichtigsten Regulatoren der Invasion von Trophoblastzellen (Poehlmann et al. 2006). Wenn nun PIBF durch RNA Interferenz ausgeschaltet ist, fällt die Aktivierung von SOCS3 durch PIBF weg. Dadurch wird STAT3 und somit dessen Einfluss auf die Invasion nicht unterdrückt. Dies könnte die erhöhte Invasivität der Zellen nach PIBF „Knockdown“ erklären. Doch es existiert auch ein Feedback-Mechanismus, der durch die Aktivierung von SOCS3 die Expression von STAT3 hemmen kann.

Ein weiterer Faktor, der das Invasionsvermögen der Zellen beeinflussen kann, ist die Dicke des Matrigels. Die Invasion von Zellen beinhaltet drei wichtige Schritte:

1. das Anheften der Zellen an die extrazelluläre Matrix (EZM)
2. Degradierung der EZM
3. Migration durch die EZM (Fisher et al. 1989)

Kliman und Feinberg konnten demonstrieren, dass Zytotrophoblastzellen je nach Dicke des Matrigels unterschiedliche Verhaltensweisen zeigen (Kliman und Feinberg 1990). Somit könnte die Invasion je nach gewählter Dicke des Matrigels verstärkt oder behindert werden.

Die Zytotoxizität ist nach dem „Knockdown“ von PIBF höher

Für die Zytotoxizitätstests wurden Lymphozyten als Effektorzellen von gesunden nicht schwangeren Spenderinnen isoliert. Es sollte die Hypothese überprüft werden, ob die Zytotoxizität peripherer Lymphozyten nach PIBF „Knockdown“ erhöht ist, da PIBF die Aktivität von NK-Zellen hemmt (Szekeres-Bartho und Wegmann 1996). NK92-Zellen, die wie uterine NK-Zellen CD56+ und CD16- sind und als deren Modell verwendet werden, wurden nicht als Effektorzellen verwendet, da diese Zellen selbst PIBF mRNA und Protein exprimieren (Lachmann et al. 2004) und womöglich dadurch selbst ihre Zytotoxizität hemmen können.

Durchgeführt wurden die Versuche mit einem Effektor/Target-Verhältnis von 10:1. Der Vergleich verschiedener Effektor/Target-Verhältnisse zeigte, dass umso weniger Zielzellen sterben, je mehr Effektorzellen vorhanden sind. Möglicherweise sind hierfür stimulierende Zytokine oder Wachstumsfaktoren verantwortlich, die von den Effektorzellen exprimiert werden, da nur ein kleiner Teil der Zellen zytotoxisch ist.

Eine normale Schwangerschaft ist mit einer niedrigen NK-Zell Aktivität assoziiert, während spontane Aborte eine erhöhte NK-Zell Aktivität zeigen (Aoki et al. 1995). Zytotoxische Mechanismen und zytotoxische Zytokine wie TNF- α können eine Plazentaablösung, Uteruskontraktionen und den Geburtsvorgang induzieren (Par et al. 2003). PIBF reguliert die NK-Aktivität über ein verändertes Zytokinprofil und hemmt die Perforinfreisetzung von NK-Zellen (Szekeres-Bartho et al. 2001b). So sollte die Präsenz oder Abstinenz von PIBF mit einer niedrigen bzw. hohen zytotoxischen Aktivität korrelieren (Szekeres-Bartho et al. 1989c).

Die Gruppe um Laskarin et al. konnte demonstrieren, dass die Behandlung dezidualer Lymphozyten mit Progesteron oder PIBF im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollen weniger zytolytische Aktivität gegen K-562 Zielzellen zur Folge hat. Die Zugabe von anti-PIBF-Antikörpern hob die Progesteron vermittelte Verminderung der Zytotoxizität vollständig auf. Dies legt die Vermutung nahe, dass PIBF am feto-maternalen Übergang an der Regulation der zytolytischen Aktivität beteiligt ist (Laskarin et al. 2002).

Faust et al. konnten zeigen, dass CD3-, CD16-, CD56+, Perforin+ uterine NK-Zellen im ersten Trimester der Schwangerschaft die größte deziduale Lymphozytenpopulation darstellen. Diese dezidualen CD56+ Lymphozyten exprimieren PIBF und zeigen, im Kontrast zu ihrem hohen Perforingehalt, der ein starkes zytolytisches Potenzial vermuten lässt (Rukavina et al. 1995), eine geringe Zytotoxizität (Faust et al. 1999). PIBF ist in der Lage, die Perforin-Freisetzung von aktivierten peripheren NK-Zellen zu blockieren, wodurch diese die Zielzellen nicht mehr lysieren können (Faust et al. 1999 und Laskarin et al. 2002). Dieser Effekt von PIBF könnte v.a. direkt am feto-maternalen Übergang eine Rolle spielen, indem er dort die lokale zytolytische Aktivität der dezidualen NK-Zellen, die wie vorher erwähnt selbst PIBF+ sind, hemmt (Szekeres-Bartho et al. 2001b). Die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests zeigen eine signifikant höhere Zytotoxizität gegenüber den Zielzellen nach PIBF „Knockdown“. Dies ließe sich durch eine ungehemmte Perforinfreisetzung der Lymphozyten erklären.

PIBF hemmt die Zytotoxizität von NK-Zellen durch eine Förderung von IL-10 und eine Hemmung von IL-12 (Szekeres-Bartho und Wegmann 1996). Durch die Förderung der IL-10 Produktion in Lymphozyten (Szekeres-Bartho et al. 2001b) bewirkt PIBF eine Aktivierung von Th2-Zellen und eine Hemmung von Th1-Zytokinen wie IFN- γ und hält somit die NK-Aktivität auf niedrigem Level. Lymphozyten gesunder Spender produzieren IL-12 (Kozma et al. 2006), welches die Produktion von IFN- γ fördert und folglich die NK-Zell-Zytotoxizität verstärkt (Trinchieri 1995). Die Gruppe um Kozma et al. konnte zeigen, dass PIBF SOCS3

aktiviert, welches an den IL-12R bindet und die STAT4 Phosphorylierung hemmt und somit eine Th1-Hemmung bewirkt (Kozma et al. 2006). Wenn PIBF vorhanden ist, kann es durch die Aktivierung von SOCS3 das IL-12 Signal hemmen. Somit wären die Lymphozyten weniger zytotoxisch. Der „Knockdown“ von PIBF könnte bewirken, dass die IL-12/STAT4-Signalkaskade eine Th1-Dominanz und somit ein höheres zytotoxisches Potenzial der Lymphozyten hervorruft.

Fehlerbetrachtung

Da es sich bei den verwendeten Zellen nicht um die Chorionkarzinomzelllinie Jar handelt, könnte dies die geringe Zytotoxizität der peripheren Spenderlymphozyten gegenüber den Zellen, die wahrscheinlich von der Maus stammen, erklären. Der Student's t-Test ergab jedoch ein signifikantes Ergebnis, das sich auch durch eine Kreuzreaktivität der Lymphozyten erklären lässt.

5.5 Vergleich der PIBF Expression in verschiedenen Zelllinien

Der Vergleich der PIBF-Expression in verschiedenen Zelllinien, darunter kanzerogene und nicht-kanzerogene Zellen sowie Hybridzellen, erbrachte unterschiedlicher Ergebnisse. Es sind mehrere Splice-Varianten von PIBF bekannt. In dieser Arbeit wurde vorrangig die Expression der 90 kDa Isoform sowie der aktiven 35 kDa Isoform ausgewertet. Beide Isoformen von PIBF wurden von allen Zellen mit unterschiedlicher Stärke exprimiert. Die PIBF-produzierende Zelllinie (shSOCS3), bei der die Expression von SOCS3 durch eine shRNA (short hairpin RNA) unterdrückt ist, zeigte die geringste Expression der „full length“ 90kDa Isoform sowie eine geringe Expression der 35 kDa Isoform. Die niedrigste Expressionsrate der aktiven 35 kDa Isoform zeigte die nichtkanzerogene Zelllinie HTR8/SVneo. Lachmann et al. konnten zeigen, dass PIBF und ebenso dessen Splice-Varianten in malignen Zellen überexprimiert werden (Lachmann et al. 2004). Dies legt nahe, dass eine Dysregulation im Splicing-Mechanismus eine Rolle bei der Tumorentwicklung spielen könnte, denn die Expressionsrate der 35 kDa Isoform zeigte sich in den onkologischen JEG-3-Zellen sowie in den Hybridzellen AC-1M59 und ACH-3P höher. Veränderungen im Splicing-Mechanismus und der Splicing-Effizienz verschiedener Gene wurden bereits mit der Progression von Tumoren und der Prädisposition für die Krebsentstehung (z.B. BRCA1) in Zusammenhang gebracht (Caballero et al. 2001 und Orban et al. 2003). JEG-3-Zellen sowie

die Hybridzelllinien AC-1M59 und ACH-3P sind zudem in der Lage, Progesteron zu produzieren, welches die Expression von PIBF-Protein erhöht (Srivastava et al. 2007). Bei der PIBF-produzierenden Zelllinie (PPZ) könnte es sich auch um maligne Zellen handeln, da die Zellen wiederholt eine starke Expression der häufigen Splice-Variante 35 kDa zeigten. Außerdem befinden sie sich seit ca. 10 Jahren in Kultur, dies deutet auch auf eine hohe Widerstandsfähigkeit hin. Nichtmaligne Zelllinien können meist nicht über einen so langen Zeitraum in Kultur gehalten werden.

Bezug zum Invasionsverhalten der Zellen

Die Hybridzelllinien AC-1M59 und ACH-3P zeigen eine unterschiedlich starke Expression der PIBF-Isoformen. Die Hybridzelllinie aus Term-Trophoblastzellen AC-1M59 exprimieren stärker PIBF-Isoformen als die ACH-3P-Zellen aus Erst-Trimester-Trophoblastzellen der 12. SSW. Der Peak der Trophoblastpenetration in den Uterus befindet sich etwa während der 12. SSW (Soundararajan und Rao 2004). Danach sinkt die Invasivität rapide ab, was für eine präzise Regulation des Invasionsverhaltens von Trophoblastzellen spricht im Gegensatz zu dem unkontrollierten Invasionsvermögen von Tumoren. Dass Term-Trophoblastzellen stärker PIBF exprimieren als Erst-Trimesterzellen spricht dafür, dass PIBF, wie auch die Ergebnisse der Invasionsassays zeigen, einen hemmenden Einfluss auf die Invasion ausübt. JEG-3 Zellen, die ein Modell für Erst-Trimester-Trophoblasten darstellen, exprimieren die PIBF-Isoformen ebenfalls weniger stark als die Term-Trophoblastzellen AC-1M59. JEG-3-Zellen besitzen vielleicht auch gerade deshalb einen invasiven Charakter. Grümmer et al. konnten in einem Invasionsassay demonstrieren, dass JEG-3-Zellen ein sehr invasives Verhalten haben. Sie zeigten die höchste Adhäsionsrate an das endometriale Epithel sowie eine schnelle und tiefe Invasion in das Stroma (Grümmer et al. 1994). Die Trophoblast-Zelllinie HTR8/SV40neo, die eine vergleichbare Invasivität wie extravillöse Trophoblastzellen aufweist, zeigt die geringste Expression der 35 kDa Isoform. Die PIBF-produzierende Zelllinie mit SOCS3-„Knockdown“ zeigt die geringste Expression der 90 kDa PIBF Isoform sowie eine niedrige Expressionsrate der 35kDa Isoform, was zu ihrem hohen Invasionspotenzial passt. Denn bei dieser Zelllinie kann man ein starkes Invasionsvermögen erwarten, da SOCS3 ein Negativ-Regulator von STAT3 ist und dieses durch den „Knockdown“ von SOCS3 nicht gehemmt wird.

5.6 Fehlerdiskussion

Um herauszufinden von welcher Spezies und von welchem Zelltyp die ursprünglich für Chorionkarzinomzellen gehaltenen Zellen sind, stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Ein durchgeführter β -HCG-Test erbrachte ein negatives Ergebnis. Das Institut für Humangenetik Jena vermutete anhand der Chromosomen, dass es sich am ehesten um Mauszellen handelt. Eine Karyotypisierung wäre bei Mauszellen nicht weiterführend, da die meisten Zelllinien von nur wenigen genetisch identischen Mausstämmen stammen. Ein MMP-Profil der Zellen könnte evtl. Rückschlüsse auf die Herkunft der Zellen geben. Es wurden bereits alle MMPs mit menschlichen Primern getestet. Hier waren nur MMP 11 und 23 positiv. Dies ließe sich damit erklären, dass nicht alle Primer eine Kreuzreaktivität mit Mauszellen zeigen.

5.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion und Regulation von PIBF untersucht werden. Hierfür wurde die Technik der RNA Interferenz angewandt und für einen effizienten „Knockdown“ von PIBF etabliert. Anschließend sollte durch funktionelle Analysen der Einfluss von PIBF bzw. dessen „Knockdown“ auf die Invasion, Proliferation und Migration von Zellen sowie die Zytotoxizität von Lymphozyten untersucht werden. Zuletzt wurden 6 verschiedene Zelllinien auf die Expression von 2 PIBF Isoformen untersucht und im Bezug auf ihr Invasionsverhalten verglichen.

Die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit lassen folgende Schlüsse bezüglich der Funktion von PIBF zu:

- Die Proliferationsassays zeigen, dass PIBF fördernd auf das Proliferationsvermögen von Zellen wirkt.
- Die Migrationsversuche ergaben keinen Anhalt für einen Effekt von PIBF auf die Migration.
- Die Invasionsassays nach RNAi lassen vermuten, dass PIBF einen inhibierenden Einfluss auf das Invasionsverhalten von Zellen hat.
- Der „Knockdown“ von PIBF war ausreichend, um die Zytotoxizität peripherer Lymphozyten zu erhöhen.
- Der Vergleich der Expression der beiden PIBF Isoformen zeigte die niedrigste Expressionsrate der aktiven 35 kDa Isoform bei der nichtkanzerogenen Zelllinie HTR8/SVneo sowie die niedrigste Expression der 90 kDa Isoform bei der PPZ (PIBF-produzierende Zelllinie) mit shSOCS3. Die Expressionsrate der 35 kDa Isoform zeigte sich dagegen in den onkologischen JEG-3 Zellen sowie in den Hybridzellen AC-1M59 und ACH-3P höher, was einerseits an einer Dysregulation im Splicing-Mechanismus in Tumorzellen liegen könnte oder andererseits daran, dass sie in der Lage sind Progesteron zu produzieren. Die PIBF-produzierende Zelllinie zeigte ebenfalls eine starke Expression der häufigen Splice-Variante 35 kDa.
- Die AC-1M59-Zellen aus Term-Trophoblastzellen exprimieren PIBF stärker als Erst-Trimesterzellen (ACH-3P-Zellen und JEG-3-Zellen). Dies bestätigt die Vermutung der Invasionsassays, dass PIBF ein Negativ-Regulator der Invasion von Zellen sein könnte. Die PPZ (PIBF-produzierende Zelllinie) mit shSOCS3, die durch den

„Knockdown“ von SOCS3 ein hohes Invasionspotenzial aufweist, zeigte die geringste Expression der 90kDa PIBF Isoform, was ebenfalls mit den Ergebnissen der Invasionsassays korreliert.

Ausblick

Diagnostische Möglichkeiten von Schwangerschaftskomplikationen

Die Gruppe um Hudic et al. konnte demonstrieren, dass die Serumkonzentration von PIBF mit einem positiven oder negativen Schwangerschaftsausgang korreliert ist (Hudic et al. 2009). So könnte man die Konzentration von PIBF und bestimmten Zytokinen, z.B. anti-inflammatorisches IL-10 und proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und TNF- α , messen, um eine Frühgeburtlichkeit durch geeignete Maßnahmen verhindern zu können.

Der Gruppe um Ivanova-Todorova et al. gelang es, einen monoklonalen PIBF Antikörper herzustellen, der es ermöglicht, PIBF in Körperflüssigkeiten nachzuweisen (Ivanova-Todorova et al. 2007). Die Detektion und quantitative Messung von PIBF in Körperflüssigkeiten oder Geweben könnte man für die Überwachung einer normalen Schwangerschaft, mögliche Frühgeburten, rezidivierende Aborte oder auch für Krebspatienten nutzen, da PIBF einen Voraussagewert bei diesen Patientengruppen haben kann.

PIBF wirkt dem abortiven Effekt von Th1-Zytokinen entgegen (Clark et al. 2002). Durch eine Substitution mit Progesteron, z.B. vaginal oder intramuskulär (Renzo et al. 2005), oder Dydrogesteron, die eine Produktion von PIBF induzieren, könnte man eventuell drohende Aborte oder Frühgeburten verhindern.

Möglichkeiten in der Tumorthherapie

Das bessere Verstehen der Eigenschaften von PIBF könnte zu einem besseren Verständnis der Entstehung und Ausbreitung von Tumoren beitragen, die durch die eigenständige Produktion von PIBF eine lokale Immunsuppression verursachen, welche das Wachstum, die Invasion und möglicherweise auch die Metastasierung erleichtert. Weiterhin könnten sich dadurch Möglichkeiten für neue Therapien von Tumoren, die PIBF produzieren, ergeben.

Es ist möglich, dass einige Tumoren in ihrer Mikroumgebung Progesteronrezeptoren in $\gamma\delta$ -T-Zellen induzieren können und diese dann auf einen Progesteronstimulus PIBF produzieren. Somit wird eine Th2-Zytokin-dominante Umgebung für den Tumor geschaffen, in der er sehr gut proliferieren kann (Check et al. 2001) und die NK-Zell Proliferation und ihre zytolytische

Aktivität unterdrückt wird (Check et al. 2009). In solchen Fällen könnte man versuchen, diese Tumoren z.B. mit Progesteronrezeptor-Antagonisten wie RU486 zu behandeln (Check et al. 2001). Dadurch wären NK-Zellen dann in der Lage die Tumoren abzustößen. Geschieht die Expression von PIBF in Tumoren unabhängig von Progesteron, besteht eine weitere Möglichkeit in der Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen PIBF (Check et al. 2009). Dies wäre möglich, da PIBF für normale Körperfunktionen nicht gebraucht wird und somit ein geringer Schaden von normalem Gewebe sowie geringe Nebenwirkungen zu erwarten sind (Check et al. 2009). Monoklonale Antikörper könnten mit Radionukleotiden gekoppelt werden, die eine tumorspezifische und zellzerstörende Radioaktivität auf die neoplastischen Zellen ausüben oder man könnte die monoklonalen Antikörper mit chemotoxischen Agenzien koppeln, die den Tumor zerstören (Check et al. 2001).

Quellenverzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1.1	Feto-maternale Grenzflächen (modifiziert nach Aagaard-Tillery et al. 2006)
Abbildung 1.2	PIBF beeinflusst das Zytokinegleichgewicht über einen neuen Typ des IL-4 Rezeptors (modifiziert nach Kozma et al. 2006)
Abbildung 1.3	Der anti-abortive Effekte von PIBF (aus Szekeres-Bartho et al. 2001b)
Abbildung 1.4	Die Struktur von 90 und 35 kDa PIBF (modifiziert nach Lachmann et al. 2004)
Abbildung 3.2	Schematische Darstellung des Mechanismus der RNA-Interferenz (http://www.life.uiuc.edu/shapiro/RNAipathway.jpg)
Abbildung 3.4	Neubauer Zählkammer (http://www.chemie-schule.de/chemieWiki/images/thumb/b/bf/Neubauer_improved_with_cells.jpg/200px-Neubauer_improved_with_cells.jpg)

Bei allen nicht im Quellenverzeichnis aufgeführten Abbildungen handelt es sich um eigene Fotos oder Darstellungen.

Literaturverzeichnis

Aagaard-Tillery KM, Silver R, Dalton J. 2006. Immunology of normal pregnancy. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 11, 279-295.

Anderle C, Hammer A, Polgár B, Hartmann M, Wintersteiger R, Blaschitz A, Dohr G, Desoye G, Szekeres-Barthó J, Sedlmayr P. 2008. Human trophoblast cells express the immunomodulator progesterone-induced blocking factor. *J Reprod Immunol.* Oct;79(1):26-36.

Aoki K, Kajiura S, Matsumoto Y, Ogasawara M, Okada S, Yagami Y, Gleicher N. 1995. Preconceptional natural-killercell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 345:1340–1342.

BD Biosciences. 2008. BD Flow Cytometry. Technical Bulletin.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM & Hannon GJ .2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363–366.

Billington WD. 1992. Transfer of antigens and antibodies between mother and foetus. In: Coulam CB, Faulk WP, McIntyre J (eds). *Immunological Obstetrics*. New York: W.W. Norton & Co., 290–304.

Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliot J, Mosmann T and Wegmann T G. 1995. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in the abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. *J. Immunol.* 154, 4261-4268.

Chaouat G, Menu E, Mognetti B, Moussa M, Cayol V, Mostefaoui Y, Dubanchet S, Khadel P, Volumnie JL, Rongires CB and Delage GL. 1997. Immunopathology of Early Pregnancy. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 5:73-92.

Caballero OL, de Souza SJ, Brentani RR, Simpson AJ. 2001 Alternative spliced transcripts as cancer markers. *Dis Markers* 17:67–75.

Check JH, Szekeres-Bartho J, O'Shaughnessy A. 1996. Progesterone induced blocking factor seen in pregnancy lymphocytes soon after implantation. *Am J Reprod Immunol.* 35(3):277-80.

Check JH, Nazari P, Goldberg J, Yuen W, Angotti D. 2001. A model for potential tumor immunotherapy based on knowledge of immune mechanisms responsible for spontaneous abortion. *Med Hypotheses*. 57(3):337-43.

Check JH and Check ML. 2002. Evidence that failure to conceive despite apparent correction of ovulatory defects by follicle-maturing drugs may be related to premature trophoblast invasion *Medical Hypotheses* 59(4), 385–388.

- Check JH**, Dix E, Sansoucie L. 2009. Support for the hypothesis that successful immunotherapy of various cancers can be achieved by inhibiting a progesterone associated immunomodulatory protein. *Med Hypotheses*. 72(1):87-90.
- Chiu L**, Nishimure M, Ishii Y, Nieda M, Maeshima M, Takedani Y, Shibata Y, Tadokoro K, Juji T. 1996. Enhancement of the expression of progesterone receptor on progesterone-treated lymphocytes after immunotherapy in unexplained spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 35:552–7.
- Clark DA**, Chaouat G, Gorczynski RM. 2002. Thinking outside the box: mechanisms of environmental selective pressures on the outcome of the materno-fetal relationship. *AJRI* 47:275–282.
- Corvinus F**, Fitzgerald JS, Friedrich K, Markert UR. 2003. Is Stat3 activation in trophoblast cells required for invasiveness. *Am. J. Reprod. Immunol.* 50,316–321.
- Coulam CB**, Goodman C, Roussev RG, Thomason EJ, Beaman KD. 1995. Systemic CD56+ cells can predict pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol* 33:40.
- Dealtry GB**, O'Farrell MK, Fernandez N. 2000. The Th2 cytokine environment of the placenta. *Int Arch Allergy Immunol* 123:107-19.
- Dong JT**, Chen C, Stultz BG, Isaacs JT, Frierson HF Jr. Deletion at 13q21 is associated with aggressive prostate cancers. 2000. *Cancer Res.* 60: 3880-3883.
- Dorsett Y** and Tuschl T. 2004. siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature review Drug discovery* Volume 3, 318-329.
- Druckmann R** und Druckmann MA. 2005. Progesterone and the immunology of pregnancy. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 97, 389–396.
- Dunn CL**, Kelly RW, Critchley HO. 2003. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online* 7(2):151-161.
- Elbashir SM**, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, and Tuschl T .2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in mammalian cell culture. *Nature* 411, 494–498.
- Faust Z**, Laskarin G, Rukavina D, Szekeres-Bartho J. 1999. Progesterone-induced blocking factor inhibits degranulation of natural killer cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 42, 71–75.
- Fire A**, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, and Mello CC .1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–11.
- Fisher SJ**, Cui TY, Zhang L, Hartman L, Grahl K, Yang ZG, Tarpey J, Damsky CH. 1989. Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro. *J Cell Biol* 109:891-902.
- Fisk HA**, Mattison CP, Winey M. 2002. Centrosomes and tumour suppressors. *Curr Opin Cell Biol* 14:700 –5.

- Frank HG**, Gunawan B, Ebeling-Stark I, Schulten HJ, Funayama H, Cremer U, Huppertz B, Gaus G, Kaufmann P, Füzesi L. 2000. Cytogenetic and DNA-fingerprint characterization of choriocarcinoma cell lines and a trophoblast/choriocarcinoma cell hybrid. *Cancer Genet Cytogenet.* 116(1):16-22.
- Fukasawa K**, Choi T, Kuriyama R, Rulong S, Vande Woude GF. 1996. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 271:1744–7.
- Geis K**, Dietl J. 2001. Die Rolle der Zytokine an der fetomaternalen Grenze. *Zentralbl Gynakol* 123: 609-618.
- Gönczy P**, Echeverri C, Oegema K, Coulson A, Jones SJ, Copley RR, Duperon J, Oegema J, Brehm M, Cassin E, Hannak E, Kirkham M, Pichler S, Flohrs K, Goessen A, Leidel S, Alleaume AM, Martin C, Ozlü N, Bork P, Hyman AA. 2000. Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature* 408, 331–336.
- Graham CH**, Lala PK. 1991. Mechanism of control of trophoblast invasion in situ. *J Cell Physiol* 148:228-34.
- Graham CH**, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK. 1993. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res.* 206(2):204-11.
- Gray SG**, Kytola S, Matsunaga T, Larsson C, Ekstrom TJ. 2000. Comparative genomic hybridization reveals population-based genetic alterations in hepatoblastomas. *Br J Cancer.* 83:1020- 1025.
- Gruber CJ**, Huber JC. 2005. The role of dydrogesterone in recurrent (habitual) abortion. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 97: 426–430.
- Grümmer R**, Hohn HP, Mareel MM, Denker HW. 1994. Adhesion and Invasion of Three Human Choriocarcinoma Cell Lines into Human Endometrium in a Three-dimensional Organ Culture System. *Placenta* 15,411-429.
- Hamilton AJ** and Baulcombe DC. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950–952.
- Hannon GJ**. 2002. RNA interference. *Nature*, 418, 244–251.
- Harborth J**, Elbashir SM, Vandeburgh K, Manninga H, Scaringe SA, Weber K, Tuschl T. 2003. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 13, 83–105.
- Hidden U**, Wadsack C, Prutsch N, Gauster M, Weiss U, Frank HG, Schmitz U, Fast-Hirsch C, Hengstschläger M, Pötgens A, Rüben A, Knöfler M, Haslinger P, Huppertz B, Bilban M, Kaufmann P, Desoye G. 2007. The first trimester human trophoblast cell line ACH-3P: A novel tool to study autocrine/paracrine regulatory loops of human trophoblast subpopulations – TNF- α stimulates MMP15 expression. *BMC Developmental Biology* 7:137.

- Hudic I**, Fatusic Z, Szekeres-Bartho J, Balic D, Polgar B, Ljuca D, Dizdarevic -Hudic L. 2009. Progesterone-induced blocking factor and cytokine profile in women with threatened pre-term delivery. *Am J Reprod Immunol* 61: 330–337.
- Hunt JS**, Miller L, Roby KF, Huang J, Platt JS, deBrot BL. 1997. Female steroid hormones regulate production of pro-inflammatory molecules in uterine leukocytes. *J Reprod Immunol* 35:87–99.
- Hsu LC**, White RL. 1998. BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12983– 8.
- Ivanova-Todorova E**, Kyurkchiev DS, Nalbanski A, Timeva T, Shterev A, Kyurkchiev SD. 2008. Production and characterization of a novel monoclonal antibody against progesterone-induced blocking factor (PIBF). *J Reprod Immunol*. 78(2):94-101.
- Joachim R**, Zenclussen AC, Polgar B, Douglas AJ, Fest S, Knackstedt M, Klapp BF, Arck PC. 2003. The progesterone derivative dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response. *Steroids* 68, 931–940.
- Judge AD**, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I. 2005. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nature biotechnology* Vol. 23 Number 4.
- Kainu T**, Juo SH, Desper R, Schaffer AA, Gillanders E, Rozenblum E, Freas-Lutz D, Weaver D, Stephan D, Bailey-Wilson J, Kallioniemi OP, Tirkkonen M, Syrjäkoski K, Kuukasjärvi T, Koivisto P, Karhu R, Holli K, Arason A, Johannesdottir G, Bergthorsson JT, Johannsdottir H, Egilsson V, Barkardottir RB, Johannsson O, Haraldsson K, Sandberg T, Holmberg E, Grönberg H, Olsson H, Borg A, Vehmanen P, Eerola H, Heikkilä P, Pyrhönen S, Nevanlinna H. 2000. Somatic deletions in hereditary breast cancers implicate 13q21 as a putative novel breast cancer susceptibility locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:9603- 9608.
- Kalinka J**, Szekeres-Bartho J. 2005. The impact of dydrogesterone supplementation on hormonal profile and progesterone-induced blocking factor concentrations in women with threatened abortion. *Am J Reprod Immunol* 53:166–171.
- Kim DH**, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ. 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol*. 23:222-226.
- Kimoto Y**. 1998. A single human cell expresses all messenger ribonucleic acids: the arrow of time in a cell. *Mol Gen Genet* 258:233–9.
- Kliman HJ**, Feinberg RF. 1990. Human trophoblast-extracellular matrix (ECM) interactions in vitro: ECM thickness modulates morphology and proteolytic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3057-3061.
- Kohler P**, Bridson W. 1971. Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 32; 683-687.

- Kozma N**, Halasz M, Polgar B, Poehlmann TG, Markert UR, Palkovics T, Keszei M, Par G, Kiss K, Szeberenyi J, Grama L, Szekeres-Bartho J. 2006. Progesterone-induced blocking factor activates STAT6 via binding to a novel IL-4 receptor. *The Journal of Immunology* 176: 819-926.
- Kwak JY**, Beaman KD, Gilman-Sachs A, Ruiz JE, Schewitz D, Beer AE. 1995. Up-regulated expression of CD56+, CD56+/CD16+ and CD19+ cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol* 34:93.
- Lachmann M**, Gelbmann D, Kalman E, Polgar B, Buschle M, von Gabain A, Szekeres-Bartho J, Nagy E. 2004. PIBF (progesterone induced blocking factor) is overexpressed in highly proliferating cells and associated with the centrosome. *Int J Cancer*: 112, 51-60.
- Lala PK** and Graham CH. 1990. Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: The role of proteases and protease inhibitors. *Cancer Metast Rev* 9; 369-379.
- Larramendy ML**, Lushnikova T, Björkqvist AM, Wistuba II, Virmani AK, Shivapurkar N, Gazdar AF, Knuutila S. 2000 Comparative genomic hybridization reveals complex genetic changes in primary breast cancer tumors and their cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.* 119:132-138.
- Laskarin G**, Tokmadzic VS, Strbo N, Bogovic T, Szekeres-Bartho J, Randic L, Podack ER and Rukavina D. 2002. Progesterone Induced Blocking Factor (PIBF) Mediates Progesterone Induced Suppression of Decidual Lymphocyte Cytotoxicity. *Am. J. Reprod. Immunol.* 48, 201–209.
- Lee SH** and Sinko PJ. 2006. siRNA—Getting the message out. *European journal of pharmaceutical sciences* 27: 401–410.
- Lottspeich F**, Engels J. 2. Auflage 2006. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag.
- Lunghi L**, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. 2007. Control of human trophoblast function. *Reproductive Biology and Endocrinology* 5:6.
- Luttmann W**, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. 2. Auflage 2006. Der Experimentator: Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag.
- Medawar PD**. 1953. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symposium of the Society for Experimental Biology*, p. 320.
- Micsik T**, Polgár B, Ráski K, Péterffy F, Schäfer E, Diófalvi K, Hollósy F, Pap A, Kopper L, Schwab R, Szekeres-Barthó J, Peták I. 2006. PIBF (Progesteron Induced Blocking Factor) is Elevated in Pancreatic Cancer Patients. *Pancreatology* 6:323–405.
- Mincheva-Nilsson L**. 2003. Pregnancy and gamma/delta T cells: Taking on the hard questions. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:120.

- Ng D**, Toure O, Wei M-H, Arthur DC, Abbasi F, Fontaine L, Marti GE, Fraumeni Jr JF, Goldin LR, Neil Caporaso N, Toro JR. 2007. Identification of a novel chromosome region, 13q21.33-q22.2, for susceptibility genes in familial chronic lymphocytic leukemia *Blood* 109:916-925.
- Nieuwenhoven van ALV**, Heineman MJ and Faas MM. 2003. The immunology of successful pregnancy. *Human Reproduction Update*, Vol.9, No.4 pp. 347-357.
- Nykanen A**, Haley B, Zamore PD. 2001. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*.107:309- 321.
- Omi K**, Tokunaga K, Hohjoh H. 2004. Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS Lett*, 558(1-3):89-95.
- Orban TI**, Olah E. 2003. Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. *J Clin Pathol Mol Pathol* 56:191–7.
- Par G**, Geli J, Kozma N, Varga P, Szekeres-Bartho J. 2003. Progesterone regulates IL12 expression in pregnancy lymphocytes by inhibiting phospholipase A2. *AJRI* 49:1–5.
- Piccinni MP**, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C, Romagnani S, Maggi E. 1995. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established T cell clones. *J Immunol* 155:128–133.
- Poehlmann TG**, Fitzgerald JS, Meissner A, Wengenmayer T, Schleussner E, Friedrich K and Markert UR. 2005. Trophoblast Invasion: Tuning Through LIF, Signalling Via Stat3. *Placenta*, Vol. 26, Supplement A, *Trophoblast Research*, Vol. 19.
- Poehlmann TG**, Fitzgerald JS, Busch S, Schleussner E, Gutiérrez G, Blois S, Arck PC, Kämmerer U, Szekeres-Bartho J, Markert UR. 2006. Reproductive Immunology – an Update *Transfus Med Hemother* 33:474–485.
- Polgar B**, Barakonyi A, Xynos I, Szekeres-Bartho J. 1999. The role of gamma/delta TCR positive cells in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 41:239–44.
- Polgar B**, Kispal G, Lachmann M, Paar C, Nagy E, Csere P, Miko E, Szereday L, Varga P, Szekeres-Bartho J. 2003. Molecular cloning and immunological characterization of a novel cDNA coding for PIBF. *The Journal of Immunology* 171:5956–5963.
- Polgar B**, Nagy E, Miko E, Varga P, Szekeres-Bartho J. 2004a. Urinary progesterone induced blocking factor concentration is related to pregnancy outcome. *Biol. Reprod.* 71: 1699–1705.
- Polgár B**, Diófalvi K, Schäfer E, Oreskovich K, Gyökeres T, Hamvas J, Varga G, Pap A, Schwab R, Szekeres-Bartho J. 2004b. Progesteron-induced blocking factor (PIBF): A potential novel tumour marker for screening and follow-up patients for gastrointestinal cancer *Z Gastroenterol*.
- Pollard TD** und Earnshaw WC. 2007. *Cell Biology*. 1.Auflage 2007 Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Porstmann J**, Arck PC. 2005. PIBF-Schlüssel zu einer erfolgreichen Schwangerschaft?. *J Fertil Reprod*; 15 (3):7-11.
- Raghupathy R**, Al Mutawa E, Maksheed M, Al-Azemi M, Azizeh F. 2007. Redirection of cytokine production by lymphocytes from women with pre-term delivery by dydrogesterone. *Am J Reprod Immunol* 58:31–38.
- Rana TM**. 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs *Nature reviews Molecular Cell Biology* Volume 8.
- Renzo Di GC**, Rosati A, Mattei A, Gojnic M, Gerli S. 2005. The changing role of progesterone in preterm labour. *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, Vol. 112, Supplement 1, pp. 57–60.
- Rieger L**, Dietl J, Kämmerer U, Sütterlin U. 2001. HLA-G positive/negative Chorionkarzinomzellen modulieren die Zytokinproduktion der CD56++ dezidualen Lymphozyten *Journal für Fertilität und Reproduktion* 11 (3).
- Rozenblum E**, Vahteristo P, Sandberg T, Bergthorsson JT, Syrjakoski K, Weaver D, Haraldsson K, Johannsdotti, HK, Vehmanen P, Nigam S, Golberger N, Robbins C, Pak E, Dutra A, Gillander E, Stephan DA, Bailey-Wilson J, Juo SH, Kainu T, Arason A, Barkardottir RB, Nevanlinna H, Borg A, Kallioniemi OP. 2002. A genomic map of a 6-Mb region at 13q21–q22 implicated in cancer development: identification and characterization of candidate genes. *Hum. Genet.* 110, 111–121.
- Rukavina D**, Rubesa G, Gudelj L, Haller H, Podack ER. 1995. Characteristics of perforin expressing lymphocytes within the first trimester decidua of human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 33:394–404.
- Salisbury JL**, Whitehead CM, Lingle WL, Barrett SL. 1999. Centrosomes and cancer. *Biol Cell.* 91: 451-460.
- Salomon LJ**, Rozenberg P, Szekeres-Bartho J, Malagrida L, Giudicelli Y and Ville YP. 2005. Changes in progesterone-induced-blocking-factor expression rates following mifepristone administration in termination of pregnancy at 5 to 8 weeks. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*,17:5,353-356.
- Soundararajan R** and Jagannadha Rao A. 2004. Trophoblast 'pseudo-tumorigenesis': Significance and contributory factors *Reproductive Biology and Endocrinology* 2:15.
- Scherr** und Eder.2007. Gene Silencing by Small Regulatory RNAs in Mammalian Cells. *Cell Cycle* 6:4, 444-449.
- Schmitz S** Hrsg.2007. *Der Experimentator Zellkultur*. 1. Auflage München:Elsevier GmbH.
- Sedlmayr, P.** 2005. Concepts of feto-maternal tolerance. In: Rukavina, D., et al. (Eds.), *Embryo implantation: from basics to clinics*. University of Rijeka, Rijeka, pp. 147–153.
- Siolas D**, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ, Hannon GJ, Cleary MA. 2005. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol.* 23:227-231.

- Sioud M** .2005. Induction of Inflammatory Cytokines and Interferon Responses by Double-stranded and Single-stranded siRNAs is Sequence-dependent and Requires Endosomal Localization. *J. Mol. Biol.* 348, 1079–1090.
- Sledz CA** and Williams BRG. 2004. RNA interference and double-stranded- RNA-activated pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 32: 952–956.
- Sledz CA** und Williams BRG. 2005. RNA interference in biology and disease. *Blood* 106: 787-794.
- Spencer TE**, Bazer FW. 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2:49.
- Srivastava MD**, Thomas A, Srivastava BI, Check JH. 2007. Expression and modulation of progesterone induced blocking factor (PIBF) and innate immune factors in human leukemia cell lines by progesterone and mifepristone. *Leukemia & Lymphoma* 48(8):1610-1617.
- Stites DP** and Siiteri PK. 1983a. Steroids as immunosuppressants in pregnancy. *Immunol. Rev.* 75,118-138.
- Stites DP**, Bugbee S, Siiteri PK. 1983b. Differential actions of progesterone and cortisol on lymphocyte and monocyte interaction during lymphocyte activation – relevance to immunosuppression in pregnancy. *J Reprod Immunol* 5:215–228.
- Szekeres - Bartho J**, Kilar F, Falkay G, Csernus V, Totok A, Pacsa AS. 1985. The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: 1. Progesterone-treated lymphocytes release a substance inhibiting cytotoxicity and prostaglandin synthesis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 9:15–18.
- Szekeres-Bartho J**, Weill BJ, Mike G, Houssin D, Chaouat G. 1989a. Progesterone receptors in lymphocytes of liver-transplanted and transfused patients. *Immunol Lett* 22: 259–61.
- Szekeres-Bartho J**, Csernus V, Hadnagy J. 1989b. The blocking effect of progesterone on lymphocyte responsiveness is receptor-mediated. *Biol Immunol Reprod* 15:36.
- Szekeres-Bartho J**, Varga P and Pejtsik B. 1989c. ELISA test for the detection of an immunological blocking factor in human pregnancy serum *Journal of Reproductive Immunology*, 16: 19-29.
- Szekeres-Bartho J**, Faust Z, Varga P. 1995. The expression of a progesterone-induced immunomodulatory protein in pregnancy lymphocytes. *Am J Reprod Immunol.* 34(6):342-8.
- Szekeres-Bartho J**, Wegmann TG. 1996. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J Reprod Immunol* 2:81–95.
- Szekeres - Bartho J**, Par G, Dombay Gy, Smart YC, Volgyi Z. 1997a. The anti-abortion effect of progesterone induced blocking factor in mice is manifested by modulating NK activity. *Cell Immunol* 177:194–199.
- Szekeres-Bartho J**, Par G, Szereday L, Smart CY, Achacz I. 1997b. Progesterone and non-specific immunological mechanisms in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 38:176–182.

Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Miko E, Polgar B and Palkovics T. 2001a. The role of $\gamma\delta$ T cells in the feto-maternal relationship. seminars in IMMUNOLOGY, Vol. 13: pp. 229–233.

Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T, Szereday L. 2001b. Progesterone as an immunomodulatory molecule. Int Immunopharmacology 1: 1037-1048.

Szekeres-Bartho J and Balasch J. 2008. Progestagen therapy for recurrent miscarriage. Human Reproduction Update, Vol.14, No.1 pp. 27–35.

Szereday L, Varga P, Szerkeres-Bartho J. 1997. Cytokine production by lymphocytes in pregnancy. Am J Reprod Immunol 38:418–22.

Trinchieri G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. Rev Immunol 13:251–276.

Trowsdale, J, Betz, AG. 2006. Mother's little helpers: mechanisms of maternal–fetal tolerance. Nat. Immunol. 7, 241–246.

Trundley A, Moffett A. 2004. Human uterine leukocytes and pregnancy. Tissue Antigens 63, 1–12.

Wegmann T, Lin H, Guilbert L, Mosmann T. 1993. Bidirectional cytokine interaction in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon. Immunol Today 14:353–356.

Xu X, Weaver Z, Linke SP, Li C, Gotay J, Wang XW, Harris CC, Ried T, Deng CX. 1999. Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. Mol Cell 3:389 –95.

Internetquellen:

<http://www.dsmz.de>

<http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>

www.microporator.com

Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. med. Udo Markert für die Bereitstellung des Themas, die gute wissenschaftliche Betreuung und die Ermöglichung der Teilnahme an internationalen Kongressen.

Tobias Poehlmann danke ich für die fachliche Betreuung und die zahlreichen Denkanstöße.

Für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Atmosphäre bedanke ich mich beim gesamten Team des Plazentalabors, im Besonderen bei

- Susann für ihre Unterstützung bei methodischen und technischen Fragen
- Maja für die Unterstützung bei der Immunzytochemie
- Katrin und Stefan für die Zusammenarbeit bei den FACS-Messungen
- Levon für die Bereitstellung der Zelllinien

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, André und meinen Freunden für die uneingeschränkte Unterstützung.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

PD Dr. med. habil. Udo R. Markert

- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 3. März 2010

Verwendete Geräte und Materialien

Geräte und Reagenzien

Geräte

Autoklav	KSG-112-Olching
Blot-Apparatur	Biometra
Brutschrank	
Hera Cell	Heraeus
Geldokumentationsgerät	
MF-ChemiBIS 3.2	Biostep GmbH
Durchflusszytometer	
FACSCalibur	BD
Elektrophoresekammer	PEQLAB Biotechnology GmbH
Filmkassette	Kisker
Floureszenzmikroskop	
Axioplan 2	Zeiss
Heizplatte MR 3001	Heidolph
Mikroporator	
MP-100	Peqlab
Mikroskop	
Axiovert 25	Zeiss
Neubauerkammer	Optik Labor
Orbitalschüttler	
Polymax 1040	Heidolph
Pipetten	Eppendorf
Spektrophotometer	
Cary UV 50	Bio Varian
Thermomixer comfort	Eppendorf
Steribank Steril GARD Hood	Baker Company
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage	
Basic	Satorius

Zentrifugen

Biofuge 13	Heraeus
Labofuge T	Heraeus
Mikro 22 R	Hettich
Universal 30 F	Hettich

Verbrauchsmaterial

Eppendorfgefäße	Sarstedt
0,5, 1,5, 2 ml	
Falcon-Tubes	Greiner
15 ml, 50 ml	
Filme	
Hyperfilm	Amersham Pharmacia Biotech
MIN- R 2000	Kodak
Filter	
Ultrafree-15	Millipore
Küvetten	Greiner
Membran PVDF	
Hybond-C Extra	Amersham Pharmacia Biotech
Zellkulturplatten	Greiner
6, 24-well	
Zellkulturflaschen	Greiner
50 ml	

Chemikalien und Reagenzien

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Bis-/Acrylamid (AA/BAA)	Roth
Bromphenolblau	Roth
Chemilumineszenz-Detektionsreagenz	
LumiGLO	Cell Signaling Technology
Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)	Invitrogen
DMEM	Bio Whittaker
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Roth
Electrolytic Buffer	Peqlab

Entwicklungs- und Fixierlösung	Kodak
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
FACS Clean	BD
FACS Flow	BD
FACS Lysing	BD
FACS Rinse	BD
Fetales Kälberserum	Bio Whittaker
GBSS	Sigma
Glycerin	Roth
Lymphozytenseparationsmedium	PAA
Matrigel	BD
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
Molekulargewicht-Marker	
Prestained Protein Marker	BioLabs
Precision Plus Protein TM Standards	BIO-RAD
Mounting-Medium	Vector Laboratories
Nagellack	Yves Saint Laurent Paris, France
Nanofectin Diluent	PAA
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodesylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	J.T. Baker
Nulkease-freies Wasser	Ambion
Oligofectamin TM Reagent	Invitrogen
Optimem	Bio Whittaker
Paraformaldehyd	Sigma
PBS	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	PAA
Poly-L-Lysin	Sigma
Ponceau S	Roth
Propidiumjodid	Sigma
Proteinase Inhibitor Cocktail	Sigma
Protein-Assay	BIO-RAD

Resuspensions Buffer	Peqlab
RPMI 1640	PAA
Sodiumdodecylsulfat	Roth
5x siRNA Annealing Buffer	Ambion
TEMED	Pharmacia Biotech
Tris-Base	Sigma
Tris-HCL	Sigma
Trypanblau	Sigma
Trypsin/EDTA	Lonza
TWEEN 20	Roth
Zelllysepuffer	Cell Signaling Technology
Ziegenserum	DAKO
Zymed-Blockierlösung	Invitrogen

Antikörper

Monoklonale Antikörper für Western Blot und Immunzytochemie

Rabbit anti-human β -Aktin	Cell Signaling Technology
Anti 48kDa rhuPIBF IgG	Universität Pecs, Ungarn

HRP-konjugierte monoklonale Antikörper

Anti-rabbit IgG	Cell Signaling Technology
-----------------	---------------------------

Floureszenz-konjugierte Antikörper

Goat anti-rabbit IgG-Cy3	Dianova
--------------------------	---------

Sequenzen der Oligonukleotide

PIBF siRNA Sequenzen:

Sequenz 1

Sense : 5' GGC UAG AGA AGA GAU GUA 3' U 99
Antisense : 5' AUA CAU CUC UUC UCU AGC 3' C 99

Sequenz 2

Sense : 5' UGC CUC UAG GGA AAU GUA 3' U 99
Antisense : 5' AUA CAU UUC CCU AGA GGC 3' A 99

Sequenz 3

Sense : 5' AGG CUA GAG AAG AGA UGU 3' A 99
Antisense : 5' UAC AUC UCU UCU CUA GCC 3' U 99

Sequenz 4

Sense : 5' GCC UCU CAC AUG AUU CAA Att 3'
Antisense : 5' UUU GAA UCA UGU GAG AGG Ctt 3'

Sequenz 5

Sense : 5' GGA UGC UUU AGA AAA ACA Ctt 3'
Antisense : 5' GUG UUU UUC UAA AGC AUC Ctt 3'

Kontroll-siRNA Sequenzen/nicht-genomische siRNA:

Stat3-Kontrolle

Sense : 5' GCC ACU UAU AAA UUC GUU Ctt 3'
Antisense : 5' GAA CGA AUU UAU AAG UGG Ctt 3'

Zusammensetzungen von Puffern, Lösungen und Gelen

10 x Laufpuffer:

0,24 M	Tris-Base	
1,9 M	Glycin	
0,1%	SDS	pH 8,5

10 x Tris-Glycin-Puffer:

0,12 M	Tris-Base
0,96 M	Glycin

Transferpuffer:

1 x	Tris-Glycin-Puffer
20%	Methanol

5 x Auftragspuffer:

50 mM	Tris-HCL
2%	SDS
0,002%	Bromphenolblau
0,1 M	DTT
10% (w/v)	Glycerin

4 x Lower Tris:

1,5 M	Tris-Base	
0,4%	SDS	pH 8,8

4 x Upper Tris:

0,5 M	Tris-HCL
0,4%	SDS

Ponceaus-S-Färbelösung:

0,1%	Ponceau S
5%	Essigsäure

Ponceau-S-Entfärber:

0,8% (w/v)	NaOH
------------	------

PBS Tween 20 (Waschpuffer)

2,4g	Tris-Base	
9,0g	NaCl	
0,1%	Tween 20	pH 7,4

5% Skimmed Milk in PBS Tween (Blockpuffer)

2,5g Milchpulver in 50 ml PBS Tween

3% Skimmed Milk in PBS Tween (Antikörperpuffer)

1,5g Milchpulver in 50 ml PBS Tween

PBS 10x (1M) für Immunzytochemie

87,9g NaCl

2,74g KH₂PO₄

11,35g Na₂HPO₄ pH 7,2

PBS/tween 20 (0,03%) für Immunzytochemie

75µl tween20 auf 25ml PBS 0,1M

Tab. 1 Zusammensetzung der Gele für SDS-PAGE

	Sammelgel (1x)	Trenngel 10,5% (1x)
AA/BAA 40% (w/v)	250 µl	1320 µl
Upper Tris 4x	625 µl	
Lower tris 4x		1250 µl
Aqua dest.	1600 µl	1430 µl
Glycerin 87% (w/v)		1000 µl
APS 40% (w/v)	9 µl	10 µl
TEMED	9 µl	6 µl